



Познавательный журнал для хороших людей

НАУКА

из первых рук

www.scfh.ru

4⁽⁷⁰⁾ ● 2016

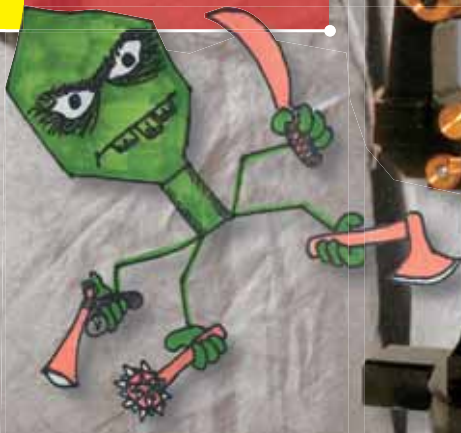


ФАГИ
АТАКУЮТ

100 ЛЕТ
НА СЛУЖБЕ
ЧЕЛОВЕЧЕСТВУ

ВИРУСЫ
И БАКТЕРИИ:
ВЕЛИКОЕ
ПРОТИВОСТОЯНИЕ

БАКТЕРИОФАГИ
ДЛЯ ЗДОРОВОЙ
ЖИЗНИ



**БАКТЕРИОФАГИ -
ВРАГИ -
НАШИХ
ВРАГОВ**



НАУКА
из первых рук

SCIENCE
First Hand

www.scfh.ru



ВСЕ
ВЫПУСКИ журнала

«Естественное желание хороших людей – добывать знание» Леонардо да Винчи

**«НАУКА
ИЗ ПЕРВЫХ
РУК»**

С 2004 по 2016 г.

<http://scfh.ru/archive/> — на русском языке

<http://scfh.ru/en/archive/> — на английском языке

На первой странице обложки:

*Семья д'Эреллей. Париж, 1919 г.
© Institut Pasteur – Musée Pasteur*

4. 2016
научно-популярный журнал



НАУКА

из первых рук



В НОМЕРЕ:

Бактериофаги «выиграли» Сталинградскую битву, не «выпустив» эпидемию холеры с территории, оккупированной немецкими войсками

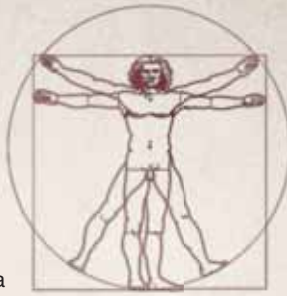
Если все бактериофаги нашей планеты выстроить «в одну шеренгу», она дотянется до ближайшего к нам скопления галактик в созвездии Девы!

Биологи научились «редактировать» геном, подсмотрев, как бактерии защищают себя от повторного заражения бактериофагом

Благодаря нитчатым бактериофагам скоро появятся энергосберегающие ультратонкие экраны

Использование бактериофагов вместо антибиотиков обеспечит экологическую чистоту продуктов питания

Познавательный журнал
для хороших людей



Редакционная коллегия

главный редактор
акад. Н.Л. Добрецов

заместитель главного редактора
акад. В.И. Бухтияров

заместитель главного редактора
акад. В.В. Власов

заместитель главного редактора
чл.-кор. Н.В. Полосьмак

заместитель главного редактора
акад. В.Ф. Шабанов

ответственный секретарь
Л.М. Панфилова

акад. И.В. Бычков

акад. М.А. Грачев

акад. А.П. Деревянко

акад. А.В. Латышев

к.ф.-м.н. Н.Г. Никулин

акад. В.Н. Пармон

акад. Н.П. Похиленко

чл.-кор. М.П. Федорук

акад. М.И. Эпов

Редакционный совет

акад. Л.И. Афтanas

акад. Б.В. Базаров

чл.-кор. Е.Г. Бережко

акад. В.В. Болдырев

акад. А.Г. Дегерменджи

проф. Э.Краузе (Германия)

акад. Н.А. Колчанов

акад. А.Э. Конторович

акад. М.И. Кузьмин

акад. Г.Н. Кулипанов

д.ф.-м.н. С.С. Кутателадзе

проф. Я. Липковски (Польша)

акад. Н.З. Ляхов

акад. В.И. Молодин

д.б.н. М.П. Мошкин

чл.-кор. С.В. Нетесов

д.х.н. А.К. Петров

проф. В. Сойфер (США)

чл.-кор. А.М. Федотов

д.ф.-м.н. М.В. Фокин

д.т.н. А.М. Харитонов

акад. А.М. Шалагин

акад. В.К. Шумный

д.и.н. А.Х. Элерт

Над номером работали

к.б.н. Л. Овчинникова
Л. Панфилова
М. Перелечаева
Е. Сычева
А. Харкевич
А. Владимиров
А. Мистрюков

к.б.н. На обложке
и в номере –
использованы рисунки
Жени Власова

«Естественное желание хороших
людей – добывать знание»

Леонардо да Винчи

Периодический научно-популярный журнал

Издается с января 2004 года

Периодичность: 6 номеров в год

Учредители:

Сибирское отделение Российской
академии наук (СО РАН)

Институт физики полупроводников
им. А.В. Ржанова СО РАН

Институт археологии и этнографии
СО РАН

Лимнологический институт СО РАН

Институт геологии и минералогии
им. В.С. Соболева СО РАН

Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

Институт нефтегазовой геологии
и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН
ООО «ИНФОЛИО»

Издатель: ООО «ИНФОЛИО»

Адрес редакции:
630090, Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 11
Тел.: +7 (383) 330-27-22, 330-21-77
Факс: +7 (383) 330-26-67
e-mail: zakaz@info-press.ru
e-mail: editor@info-press.ru

www.scfh.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор)

Свидетельство ПИ № ФС77-37577
от 25 сентября 2009 г.

ISSN 1810-3960

Тираж 1 500 экз.

Отпечатано в типографии
ООО «ИД „Вояж“» (Новосибирск)

Дата выхода в свет 15.11.2016

Свободная цена

Перепечатка материалов только
с письменного разрешения редакции

© Сибирское отделение РАН, 2016

© ООО «ИНФОЛИО», 2016

© Институт физики полупроводников
им. А.В. Ржанова СО РАН, 2016

© Институт археологии и этнографии
СО РАН, 2016

© Лимнологический институт СО РАН,
2016

© Институт геологии и минералогии
им. В.С. Соболева СО РАН, 2016

© Институт химической биологии
и фундаментальной медицины
СО РАН, 2016

© Институт нефтегазовой геологии
и геофизики им. А.А. Трофимука
СО РАН, 2016

Дорогие друзья!

Очередной выпуск нашего журнала посвящен столетию открытия бактериофагов. Бактериофаги – это мельчайшие вирусы, сыгравшие в развитии науки роль, которую трудно переоценить.

Как известно, вирусы – это самые маленькие живые организмы на Земле; более того, есть даже мнение, что называть их «живыми» не совсем правильно, настолько просто они устроены. По сути, они представляют собой генетическую программу в виде цепочек ДНК или РНК, «упакованную» в некую белковую оболочку. Вирусные гены могут «работать» только в живой клетке другого организма, встраиваясь в хозяйский геном и заставляя клеточную «метаболическую машину» производить новые копии вирусных частиц. Бактериофаги (дословно – «пожиратели бактерий»), как и другие вирусы, являются внутриклеточными паразитами, вот только используют в качестве хозяина не животных и растения, а одноклеточные бактерии и археи.

В последние годы стало ясно, что бактериофаги играют огромную роль в биосфере: контролируя численность микробной флоры, они являются одним из основных факторов, препятствующих ее безудержному росту. Неудивительно, что число самих бактериофагов огромно – их суммарная биомасса достигает 10^9 тонн, тогда как общую массу живых организмов оценивают всего на 2–3 порядка больше. Бактериофаги – не просто самая распространенная форма жизни на Земле: являясь неотъемлемой частью трофических циклов, они активно участвуют в глобальном круговороте вещества и энергии.

Из-за способности специфически поражать лишь определенные штаммы бактерий бактериофагов стали использовать, хотя и с переменным успехом, как очень «точное» и безопасное средство борьбы с бактериальными инфекциями у человека и животных практически с самого момента их открытия в начале прошлого века. Сама история этого открытия представляет собой увлекательный роман, среди героев которого выделяются две драматические и трагические фигуры – гениальный французский самоучка Феликс д'Эрелль и его ближайший соратник и друг, грузинский микробиолог Георгий Элиава.

Время, в которое они работали и творили, было эпохой войн и революций, до основания потрясших основы гражданского общества, да и сами они были не из тех, кто готов укрыться от реальности в «башне из слоновой кости». Первооткрывателем бактериофагов д'Эреллю, который в семидесятилетнем возрасте несколько лет провел под домашним арестом за отказ помочь немецким оккупантам, пришлось под конец жизни увидеть, как его любимое детище уступает под все более стремительным натиском антибиотиков. А Элиава, отказавшийся от приглашения в знаменитый парижский Институт Пастера со словами «я нужен Грузии» и создавший в Тбилиси первый и единственный в мире



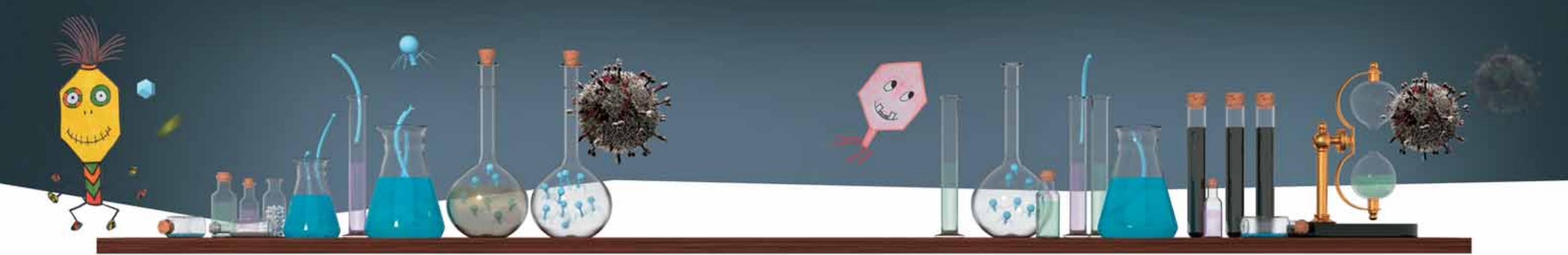
центр исследования бактериофагов, был расстрелян на родине как «враг народа».

Однако гениальная идея использовать для борьбы с бактериями живое «биологическое оружие» пережила своих создателей. Многие годы исследования бактериофагов были сосредоточены в нашей стране, причем первую серьезную проверку фаговая терапия прошла во время Великой Отечественной войны. Достаточно сказать, что за победу в знаменитой Сталинградской битве «сражался» и холерный бактериофаг, произведенный прямо в осажденном городе – благодаря ему удалось локализовать эпидемию холеры на территории, занятой немецкими войсками.

Дальнейшая история фаговой терапии служит прекрасной иллюстрацией философского тезиса, что любое развитие идет по спирали. В 1980-е гг. стало ясно, что эффективность лечения антибиотиками значительно понизилась из-за развивающейся на фоне их приема лекарственной устойчивости. Ученые и медики всего мира вновь обратили свое внимание на бактериофаги. Ведь уникальные преимущества этих препаратов перед антибиотиками заключаются, в первую очередь, в их направленном действии на определенный штамм и вид бактерии, при котором не страдает обычная микрофлора организма, и их можно безопасно использовать не только для лечения, но и профилактики инфекций.

Конечно, никто сегодня категорически не утверждает, что на современном этапе развития науки бактериофаги могут полностью заменить другие антибактериальные препараты в медицине и сельском хозяйстве, однако все публикации этого выпуска ясно свидетельствуют, что в лице бактериофагов человечество может обрести не только «соседа» по биосфере, но и сильного и верного союзника.

Академик Н.Л. Добрецов,
главный редактор



.01

НАУКИ О ЖИЗНИ

- 6 **В.В. Власов**
Бактериофаги: враги наших врагов
- 8 Под знаком бактериофага:
Париж – Тбилиси
- 22 **Т.В. Присада, М.Г. Ефимова, А.Н. Дабижева, Н.Н. Ворошилова**
Фаги атакуют. Отечественная история производства и применения бактериофагов
- 32 **Е.И. Рябчикова, А.Ю. Юнусова**
Бактериофаг, мы тебя видим
- 40 **В.В. Власов, В.В. Морозова, И.В. Бабкин, Н.В. Тикунова**
Бактериофаги: 100 лет на службе человечеству
- 50 **А.А. Ширяева, А.В. Строчкая, К.В. Северинов**
Вирусы и бактерии. Великое противостояние

ТРАСПЛАНТАЦИЯ в кишечник больного фекальной микрофлоры от здорового донора, содержащей набор «**ПОЛЕЗНЫХ**» БАКТЕРИЙ и «**ПРАВИЛЬНЫХ**» БАКТЕРИОФАГОВ – почти мгновенное лечение **ДИСБАКТЕРИОЗА**. С. 58

Литические **ФАГИ** прицельно уничтожают **ПАТОГЕННЫЕ** бактерии, сохраняя нормальную **МИКРОФЛОРУ**. С. 66

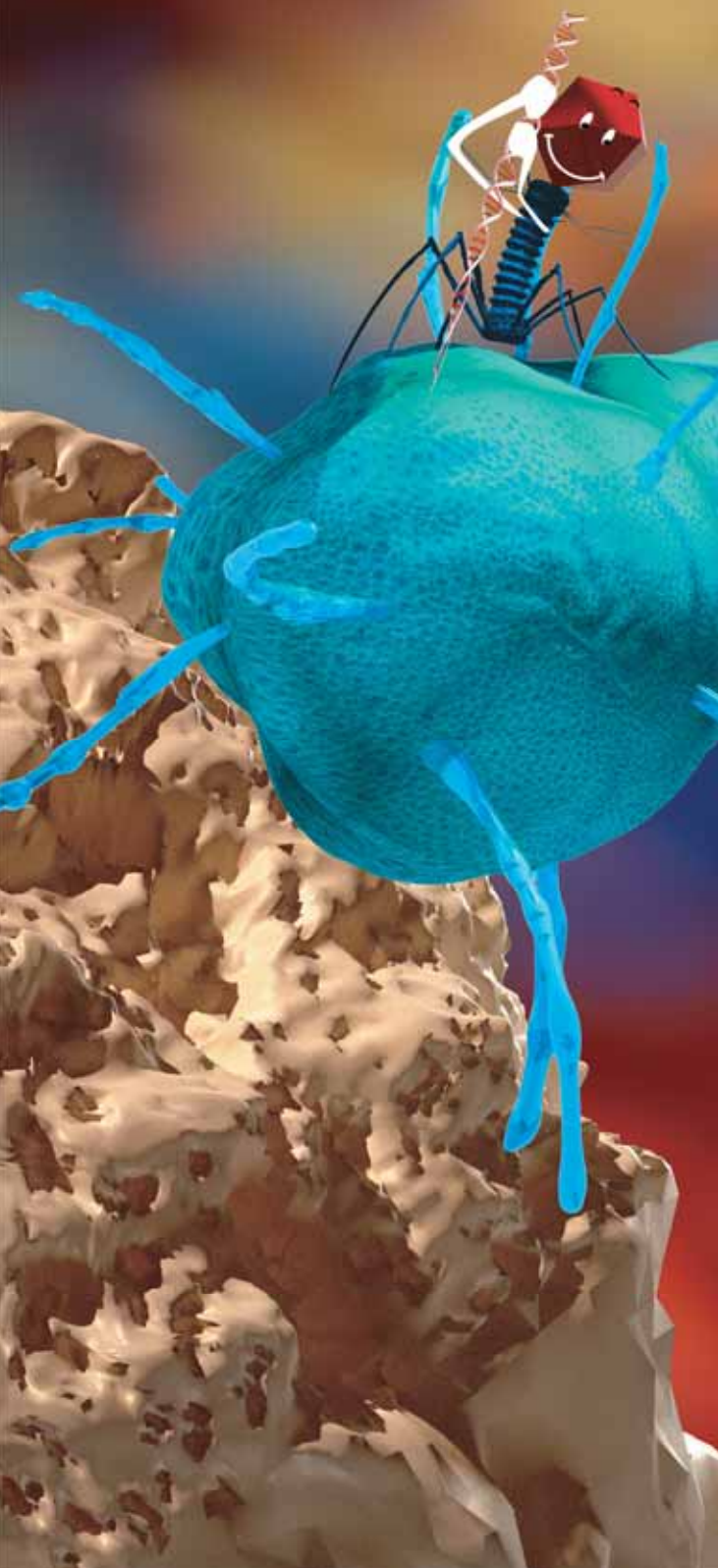
Применение **БАКТЕРИОФАГОВ** для борьбы с **БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ** в тепличных хозяйствах позволит получать не только большой, но и **ЭКОЛОГИЧЕСКИ** чистый **УРОЖАЙ** овощей и зеленных культур. С. 74

Фаговые препараты могут стать хорошей **АЛЬТЕРНАТИВОЙ АНТИБИОТИКАМ** в промышленном **ЖИВОТНОВОДСТВЕ**, где разнообразие возможных патогенов ограничено. С. 82

- 58 **В.В. Власов, В.В. Морозова, Н.В. Тикунова**
Правда о фаготерапии, или *Памятка врачу и пациенту*
- 66 **А. Сулаквелидзе**
Бактериофаги для здоровой жизни
- 74 **К.А. Мирошников**
Фаги на грядках. Проблемы и перспективы применения бактериофагов в растениеводстве
- 82 **В.Н. Афонюшкин, М.Л. Филипченко, Ю.Н. Козлова**
Наноболиты. Бактериофаги как альтернатива антибиотикам в ветеринарии
- 88 **Е.В. Лихошвай**
В каждой капле воды – вирусы!



БАКТЕРИОФАГИ — враги наших врагов



Что такое бактериофаг? Большинство ответит, что это медицинский препарат, о котором они слышали от докторов. Некоторые скажут, что бактериофаги (или просто фаги) – это мельчайшие вирусы, поражающие бактерии, а биологи расскажут много удивительных историй о том, как были открыты эти мельчайшие вирусы, какую важную роль сыграли они в развитии науки, и какие перспективы сулят современные технологии на их основе.

Когда сто лет назад были открыты эти убийцы бактерий, они сразу привлекли к себе огромное внимание: энтузиасты поверили в возможность полного избавления человечества от инфекционных заболеваний с помощью чудесных вирусов. Широкую известность новому методу лечения – *фаготерапии* – обеспечила публикация в 1925 г. знаменитого романа «Эрроусмит» американского писателя Синклера Льюиса, где рассказывалась идеализированная история молодого микробиолога, ставшего первооткрывателем нового чудодейственного лекарства. За свой роман автор получил Нобелевскую премию по литературе, однако в реальности чуда не произошло: недостаточные знания биологии вирусов и отсутствие ключевых молекулярных технологий в те далекие годы не позволили полностью раскрыть терапевтический потенциал бактериофагов, и интерес к ним, особенно в западных странах, был утрачен.

В 1950-х гг. бактериофаги вновь привлекли к себе внимание, но уже в качестве простейших биологических объектов, обладающих собственными генетическими программами. Используя этих «подопытных», ученые рассчитывали выяснить базовые механизмы функционирования живых систем. Надежды оправдались в полной мере: изучая гены и белки фагов, удалось получить ответы на важнейшие вопросы, касающиеся основ жизни. В ходе этих исследований были «попутно» разработаны базовые технологии, которые дали начало новому перспективному направлению – генетической инженерии.

В последние годы интерес к бактериофагам резко возрос. Новые знания о распространении и многообра-

зии бактериофагов ясно показали, насколько важную роль эти мельчайшие организмы играют в биосфере. О бактериофагах стали говорить, как о «темной материи» биосферы: по некоторым оценкам, их численность на Земле составляет около 10^{31} вирусных частиц, а их общая масса – 10^9 тонн. Даже в желудочно-кишечном тракте человека содержится около 10^{12} бактериофагов, т. е. почти 0,5 мг.

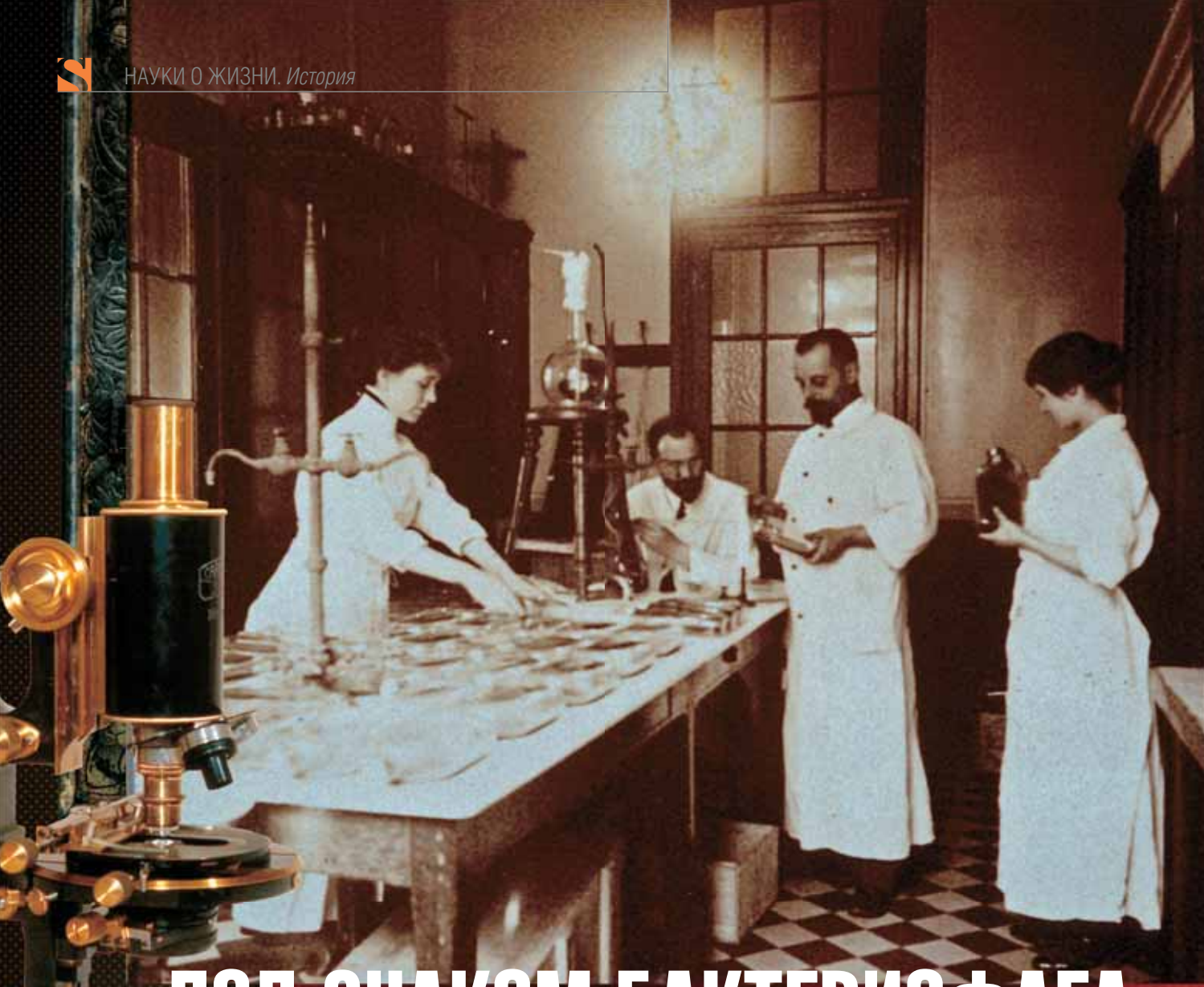
Сегодня фаги являются незаменимым инструментом молекулярных биологов, позволяющим оперировать с ДНК, решая задачи синтетической биологии. При исследовании механизмов защиты и нападения, используемых фагами и бактериями в их извечной войне, были открыты ферменты и нуклеиново-белковые комплексы, которые позволили создать методы редактирования, совершившие революцию в биологических исследованиях и открывшие принципиально новые возможности для медицины завтрашнего дня. Ферменты бактериофагов используют как биологически активные вещества, а сами они являются основой для создания нанобъектов заданной структуры, которые можно использовать в самых разных целях – от доставки лекарственных препаратов и создания биосенсоров для диагностических систем до производства материалов для нанoeлектроники.

Но все-таки главные области применения фагов в настоящем и будущем связаны с их основным свойством – уничтожать бактерии. Бактериофаги уже применяются как средства дезинфекции в различных областях сельского хозяйства, ветеринарии и пищевой промышленности – везде, где необходимо предотвратить размножение бактерий и защитить от них живые и органические объекты. В связи с распространением антибиотикоустойчивых микроорганизмов во всех развитых странах активизировались исследования, цель которых – создание новых медицинских технологий лечения и профилактики инфекционных заболеваний, благодаря которым фаготерапия должна стать важнейшей частью персонализированной медицины XXI века.



Научный редактор выпуска,
заместитель главного редактора
журнала «НАУКА из первых рук»
академик В. В. Власов





ПОД ЗНАКОМ БАКТЕРИОФАГА:

Париж — Тбилиси

Многие страницы истории науки читаются как увлекательный роман, и это в полной мере относится к истории открытия вирусов бактерий — бактериофагов. Две ее знаковые фигуры — гениальный французский самоучка, известный нам под именем Феликса д'Эрелля, и принадлежащий к известной грузинской фамилии советский микробиолог Георгий Элиава, — еще при жизни были окутаны мифами и легендами, а некоторые драматические и трагические эпизоды их жизни, судя по всему, так и останутся за «кадром», в отличие от их признанных научных достижений



НАЧАЛЬНИК 4 ОТДЕЛА ПУТЬ НАВД
СТАРШИИ МАЮР ГОСУДАР. БЕЗОПАСНОСТИ:
(ЛИТ ВАН)

По большому счету эта история началась еще в XVII в., когда Антони ван Левенгук, преуспевающий торговец сукном из голландского города Дельфта, увидел в окуляре сконструированного им микроскопа крошечных шустрых «анимакулей» — «зверушек» без хвоста и головы, не похожих ни на одно известное животное. Так человечество впервые узнало о своих могущественных, хотя и недоступных невооруженному глазу соседях по планете — огромном мире бактерий, которые обнаруживались буквально везде: в почве, прудовой тине, гнилом мясе, зубном налете...

Удивительно, но эти микроскопические создания долгое время считались вполне «невинными», т. е. не имеющими никакого отношения к заболеваниям человека: практически до конца XVIII в. в умах продолжала господствовать «миазматическая теория» самопроизвольного зарождения, согласно которой все патологии имели исключительно внутреннюю причину. Идея о «живом возбудителе» окончательно победила лишь в первой половине XIX в., когда в опытах по самозаражению и моделированию заболеваний у животных была доказана патогенная роль микроорганизмов. Свою роль в этом сыграли и отечественные ученые, такие как военный врач Д. С. Самойлович, который во время эпидемии чумы в Москве в начале 1770-х гг. показал, что заражение происходит при непосредственном соприкосновении с больным или его вещами. И хотя непосредственно «увидеть» возбудителя чумы ему не удалось, он стал первым, кто предложил идею профилактических прививок путем введения «заразного ослабленного начала».

Как известно, эффективность вакцинации для профилактики опасной инфекции человека — натуральной оспы, была официально доказана английским врачом Э. Дженнером в 1796 г. Однако лишь спустя сто лет после этого события был открыт новый тип «анимакулей», вызывающих как это, так и множество других

Ф. д'Эрелль в лаборатории Института Пастера (Париж) и его главный инструмент — микроскоп фирмы «Карл Цейсс». 1919 г. © Institut Pasteur — Musée Pasteur Слева внизу: публикация в газете «Вечерний Тифлис» (апрель 1935 г.), посвященная выходу книги Ф. д'Эрелля «Бактериофаг и феномен выздоровления», переведенной на русский язык его другом и соратником Г. Г. Элиавой, директором грузинского НИИ бактериофага

заболеваний, и которых было невозможно увидеть не только в «лупу» Левенгука, но и в гораздо более мощные оптические микроскопы. В конце XIX в. русский физиолог растений Д. И. Ивановский, голландский ботаник и микробиолог М. Бейеринк и немецкие микробиологи Ф. Леффлер и П. Фрош открыли мельчайшие организмы, которые с легкостью проходили сквозь поры фарфоровых фильтров, задерживающих самые мелкие бактерии. Бейеринк назвал их *вирусами* (от лат. *virus* — «яд») — это слово использовал еще сам основатель микробиологии и иммунологии Л. Пастер для обозначения некоего заразного начала.

К слову сказать, сама идея существования принципиально новых представителей микромира была принята научным сообществом далеко не сразу: еще в начале XX в. высказывались предположения, что вирусы являются просто либо очень мелкими бактериями, либо токсическими веществами, которые выделяются внутри обреченных клеток под воздействием каких-то неизвестных факторов. Точку в этом споре поставило открытие способности этих крошечных созданий поражать не только растения и животных, но и другие микроорганизмы.

Впервые действие неизвестной субстанции с антибактериальным эффектом описал еще в 1896 г. английский бактериолог Э. Ханкин при изучении действия воды некоторых индийских рек на возбудителя холеры. Целебные свойства воды сохранялись после прохождения через бактериальный фильтр, но пропадали после кипячения. Ученый предположил, что именно этот феномен, названный впоследствии «парадоксом Ханкина», сдерживает распространение холеры среди местного населения, но не дал ему объяснения. А еще через два года русский микробиолог Н. Ф. Гамалея описал растворение (*лизис*) палочек сибирской язвы в дистиллированной воде под действием неизвестного агента и установил способность полученного раствора вызывать разрушение свежих культур возбудителя.

Тем не менее механизм этого явления был детально изучен лишь десятилетия спустя в работах английского микробиолога Ф. Туорта (совместно с А. Лондом) и канадско-французского ученого Ф. д'Эрелля, которые независимо друг от друга описали фильтрующиеся, передающиеся агенты, вызывающие разрушение бактериальных клеток. С легкой руки д'Эрелля их стали называть *бактериофагами* (буквально — «пожирателями бактерий»).

Аперитив из агавы

Поразительный факт: человек, заслуженно считающийся одним из первооткрывателей бактериофагов и восемь (!) раз номинированный на Нобелевскую премию, не только не имел высшего биологического образования, но окончил лишь среднюю школу! А за запоминающейся внешностью испанского идадьго у этого гениального самоучки билось сердце настоящего авантюриста. По крайней мере так можно судить по описаниям жизни д'Эрелля, особенно ее раннего периода, о котором имеющиеся на сегодня литературные источники дают зачастую противоречивые сведения, так что мы сможем лишь приблизительно очертить траекторию его жизненного пути.

Так, в некоторых публикациях утверждается, что Феликс родился в Монреале в семье французских эмигрантов и переехал в Париж уже в шестилетнем возрасте после смерти отца. Однако по последней версии д'Эрелль, которого в действительности звали Хьюберт Феликс Августин Херенц (Haegens), родился 25 апреля 1873 г. в Париже от неизвестного отца и 24-летней Августины Херенц, рантье, как это указано в его свидетельстве о рождении. Он действительно получил только среднее образование, обучаясь в двух парижских лицеях, в том числе Людовика Великого, где не отличался хорошей успеваемостью, а позднее в течение немногих месяцев

посещал лекции по медицине в Европе, предположительно, в Боннском университете. Есть данные, что в возрасте 20 лет он вместе со своим младшим братом Даниэлем поступил добровольцем во французскую армию, откуда через год дезертировал по неизвестным причинам.

Феликса всегда отличала страсть к путешествиям: еще школьником он исколесил на велосипеде почти всю Западную Европу, а затем путешествовал в Южной Америке, Греции, Бельгии... В Турции он встретил свою будущую жену Мари.

В возрасте 24 лет Феликс, уже муж и отец, эмигрировал в Канаду, где «поменял» национальность и принял новое имя д'Эрелль (печатаемая на английских машинках, он часто писал его как *Herelle*) – не исключено, из-за опасений последствий своего дезертирства. Вначале ему повезло: по дружеской протекции д'Эрелль получил заказ канадского правительства на изучение процессов брожения и дистилляции кленового сиропа при производстве шнапса. А в 1899 г. он даже принял участие в геологической экспедиции в поисках золота на полуостров Лабрадор на востоке Канады в качестве медработника, практически не имея никакой специальной подготовки. Заработанные деньги он вместе с братом вложил в шоколадную фабрику, которая почти сразу обанкротилась.

К этому времени Феликс был отцом уже двух дочерей, и чтобы обеспечить семью, отправился ... в Новый свет, где по контракту с правительством Республики Гватемала стал работать бактериологом

Научная карьера Ф. д'Эрелля началась в Мексике на плантациях сизаля, где он не только первым в мире использовал патогенные бактерии в борьбе с саранчой, но и впервые наблюдал действие бактериофага. Мексика, 1941 г.
© Institut Pasteur – Musée Pasteur

в столичной больнице общего профиля, занимаясь лечением малярии и желтой лихорадки. Очевидно, что все это время д'Эрелль, далекий от медицины, но явно увлекшийся микробиологией, продолжал заниматься самообразованием. Попутно на основе своего опыта в алкогольном производстве д'Эрелль взялся разработать процесс получения виски из бананов. Жизнь в южноамериканской стране, которая в конце XIX в. пережила несколько гражданских войн и стала символом хронической нестабильности и междоусобицы, была далека от цивилизованной и просто безопасной, но Феликсу с его авантюрной жилкой оказалась явно по душе: по его словам, именно в Гватемале начался его путь в большую науку.

«Алкогольная» карьера д'Эрелля шла в гору: в 1907 г. в возрасте 30 лет он принял предложение правительства Мексики заняться технологией производства крепкого алкогольного напитка из сока агавы – из этих растений семейства лилейных, как известно, производят не только грубое волокно сизаль, но и знаменитую текилу. Переехав с семьей на плантацию сизаля в Юкатане, он вскоре действительно разработал новый способ получения «шнапса из агавы». За оборудованием, необходимым для массового производства алкоголя, которое было заказано во французской столице, отправился сам изобретатель.

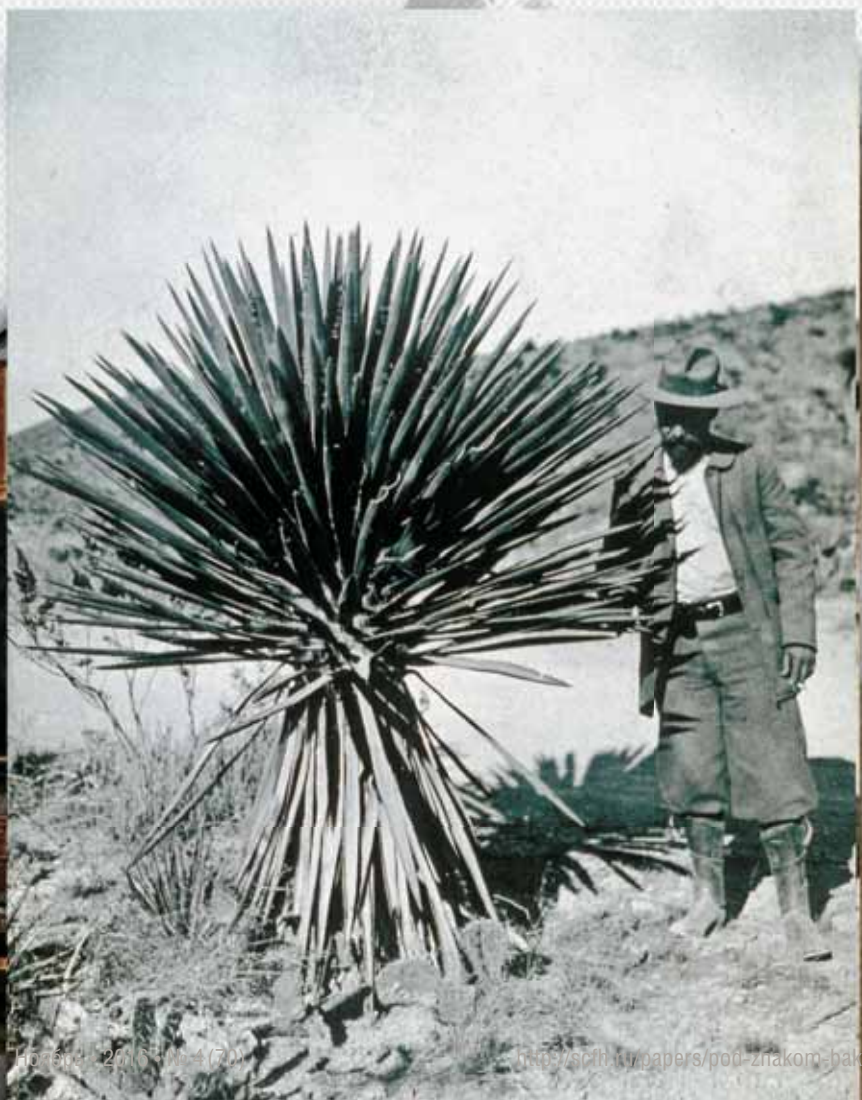
Так началась новая эпоха в жизни Феликса д'Эрелля: именно в Париже располагался знаменитый Институт Пастера, где он стал проводить свое свободное время, работая в качестве бесплатного помощника. Вернувшись в Мексику, д'Эрелль потерял интерес к работе на новом заводе, посчитав ее скучным занятием. Но увлекся другой, уже микробиологической проблемой, связанной с нашествием перелетной саранчи, уничтожившей плантации сизаля на полуострове



Феликс д'Эрелль (Хьюберт Феликс Августин Херенц) – выдающийся ученый-микробиолог, неоднократно номинированный на Нобелевскую премию, был самоучкой без высшего образования. 1905 г.
© Institut Pasteur – Musée Pasteur

Юкатан. Заметив, что эти насекомые массово гибнут от неизвестной болезни, сопровождаемой тяжелыми поражениями кишечника, он выделил из их трупов бактерию *Coccobacillus* и предложил использовать ее для борьбы с «казню египетской».

Эта работа окажется для д'Эрелля судьбоносной, пока же отметим, что именно он впервые выдвинул идею биологического способа борьбы с сельскохозяйственными вредителями. И хотя его более поздние попытки применить такой способ борьбы с нашествием саранчи в Гватемале, Аргентине и Тунисе не увенчались полным успехом, о д'Эрелле впервые заговорили в научных кругах. До этих пор, как говорится во французской Википедии, его научная карьера выглядела как карьера шарлатана.





Ф. д'Эрелль в лаборатории Института Пастера, где создавались вакцинные препараты (Париж).
© Institut Pasteur – Musée Pasteur

Этот „агент“, названный мной бактериофагом, обладает способностью размножаться за счет бактерий. Явление бактериофагии может быть воспроизведено в экспериментальных условиях с той же яркостью, с какой оно происходит в организме. Последующие опыты показали, что бактериофаг ведет себя во всем как существо, одаренное жизнью, как микроорганизм чрезвычайно малых размеров, паразитирующий на бактериях. Бактериофаг имеет корпускулярное строение и воздействует на бактерии через посредство продуцируемого им фермента...».

Поразительно, что все свои выводы д'Эрелль сделал на основе эмпирических наблюдений, интуиции и здравого смысла – увидеть бактериофаг «воочию» удалось лишь 22 года спустя Э. Руске, изобретателю просвечивающего электронного микроскопа.

Но был ли д'Эрелль первым? Ведь еще в 1915 г. англичанин Ф. В. Туорт описал «фактор», который приводил к «прозрачному перерождению» колоний гнойного стафилококка, растущих на поверхности питательной среды, и который легко проходил через фильтры, задерживающие бактерии, что роднило его с уже известными вирусами.

Фактически обвиненный в плагиате, многие годы д'Эрелль в деталях излагал историю своего открытия, которое он фактически сделал еще в далеком 1910 г.: «Я находился в Мексике, в штате Юкатан, когда началось нашествие саранчи. К счастью, среди саранчи началась эпидемия. Я отправился в поля кукурузы и начал собирать больных насекомых с выраженными признаками смертельной диареи <...> Я сделал посеvy испражнений болеющих и погибших насекомых и обнаружил микроорганизмы – коккобактерии, явившиеся причиной смертельной инфекции, поразившей саранчу. Изучив чашки Петри с посевами, я обнаружил некоторые аномалии в росте микробной культуры. Эти аномалии представляли собой прозрачные участки округлой формы, двух или трех миллиметров в диаметре, обнаруженные на культуре микроорганизма, выросшего на поверхности питательного агара. Я соскреб с поверхности агара эти прозрачные „бляшки“ и приготовил мазки. Под микроскопом ничего не обнаружилось. На основании этого и других экспериментов я пришел к выводу, что некое начало, которое приводит к образованию прозрачных участков на микробной культуре, должно быть настолько малым в размере, чтобы беспрепятственно проходить через фильтры <...> которые задерживают бактерии».

Спасибо саранче

В 1911 г. семья д'Эреллей возвращается в Париж, а ее глава начинает работать в Институте Пастера, занимаясь разработкой метода приготовления вакцины на модельной системе – палочке мышинного тифа и домовой мыши, ее природном хозяине, а в свободное время обследуя дизентерийных больных в расквартированном под Парижем кавалерийском эскадроне.

О своем открытии, навсегда обеспечившем ему место на научном олимпе, 44-летний д'Эрелль официально объявил в 1917 г.: «д-р Ру [директор Института Пастера] представил Академии наук мой доклад, озаглавленный „Невидимый микроорганизм, антагонист возбудителей дизентерии“. В тексте доклада я называл этот микроорганизм бактериофагом... Я наблюдал, что при бациллярной дизентерии, незадолго до исчезновения кровяного стула и выздоровления, в кишечнике появляется какой-то „агент“, некое начало, обладавшее способностью растворять дизентерийные палочки. У больных, умерших от дизентерии, „агент“ не обнаруживается.

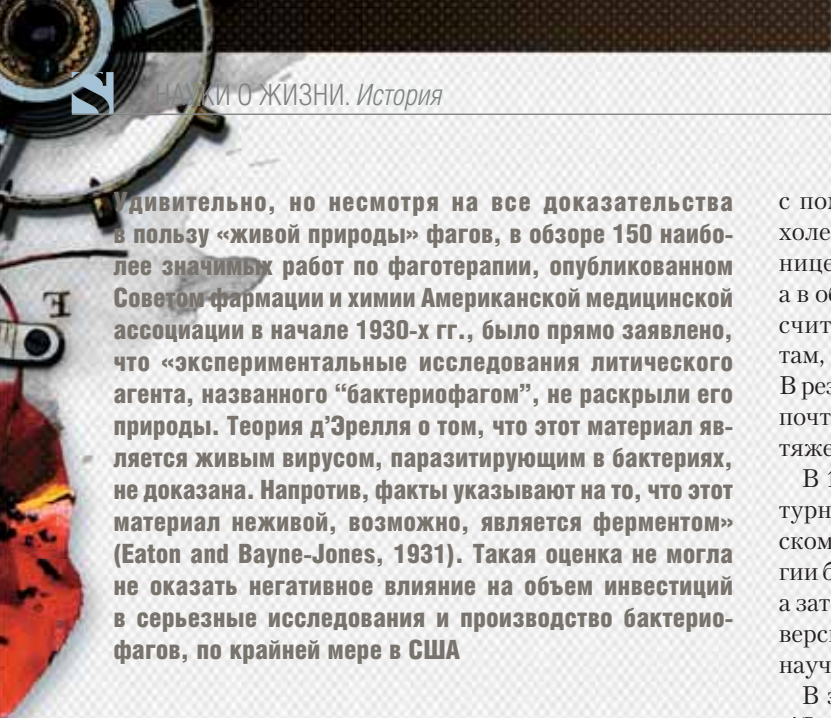
Результаты начального этапа изучения бактериофагов Ф. д'Эрелль изложил в фундаментальном труде «Бактериофаг» (1922), где подробно описал процессы лизиса бактериофага, выделения фагов из инфекционных бактерий и факторы, регулирующие стабильность внеклеточного фага. За год до этого его последователи Р. Брайонг и Д. Мэйсин впервые официально сообщили об эффективности лечения стафилококковых инфекций кожи с помощью стафилококкового фага. Из-за роста общественного интереса к возможностям фаговой терапии многие частные европейские компании начали массово выпускать коммерческие препараты бактериофагов. Одной из первых среди них стала, по-видимому, «Французская компания по производству безопасных красок для волос», основанная в 1909 г., которая сегодня пользуется мировым признанием под именем L'Oreal

Собственно говоря, нет ничего удивительного в том, что д'Эрелль, будучи в то время малоизвестным ученым, не торопился обнародовать свои наблюдения, пока не получил еще одно подтверждение своего открытия в виде дизентерийного бактериофага. В любом случае в своей первой публикации он, в отличие от Туорта, не только дал точное описание феномена бактериофагии, но и предсказал возможность создания «живого лекарства» – не исключено, что и эта мысль стала продолжением его революционной идеи использовать живые микроорганизмы в борьбе с вредителями.

Слово этого человека, привыкшего незамедлительно решать возникшие перед ним практические задачи, не разошлось с делом. Всего лишь через два года в детском госпитале в Париже он вместе с профессором В.-А. Гутинелем провел первый эксперимент по

Семья д'Эреллей: слева от ученого – его жена Мари Клер, справа – младшая дочь Хьюберта и старшая Марселла. Париж, 1919 г.
© Institut Pasteur – Musée Pasteur





Удивительно, но несмотря на все доказательства в пользу «живой природы» фагов, в обзоре 150 наиболее значимых работ по фаготерапии, опубликованном Советом фармации и химии Американской медицинской ассоциации в начале 1930-х гг., было прямо заявлено, что «экспериментальные исследования литического агента, названного “бактериофагом”, не раскрыли его природы. Теория д’Эрелля о том, что этот материал является живым вирусом, паразитирующим в бактериях, не доказана. Напротив, факты указывают на то, что этот материал неживой, возможно, является ферментом» (Eaton and Bayne-Jones, 1931). Такая оценка не могла не оказать негативное влияние на объем инвестиций в серьезные исследования и производство бактериофагов, по крайней мере в США

лечению дизентерии с помощью бактериофага. Чтобы убедиться в безопасности нового препарата, д’Эрелль и его сотрудники, как это было принято в то время, предварительно сами приняли немалую дозу. Этому клиническому испытанию предшествовали успешные опыты на курах, больных куриным тифом, в которых с помощью фагов, выделенных из куриного помета, удалось понизить смертность с 95 до 5%!

На вершине

Уже первая публикация д’Эрелля вызвала настоящий бум в научном сообществе: в многочисленных исследованиях все больше и больше ученых подтверждали его правоту, фаготерапия начала завоевывать позиции в медицине Западной Европы, а сам д’Эрелль упрочил свое положение в Институте Пастера, где он в течение нескольких лет работал неоплачиваемым помощником. Но и в это время жизнь этого любителя приключений с горячим нравом и беспокойным характером зачастую проходила далеко от академической тишины лаборатории – в исследовательских экспедициях, организованных Институтом Пастера в Аргентине, Англии, Турции, Тунисе и Мексике. А многие свои дальнейшие путешествия, сделанные с научной целью, он предпринимал за свой счет.

Институт Пастера д’Эрелль покинул к 1925 г. по причинам, которые остались до конца невыясненными (как предполагают, из-за разногласий с институтским руководством). В Нидерландах, где он занял временную должность куратора в Институте тропической патологии, он опубликовал свою первую книгу и получил звание почетного доктора Университета Лейдена; в Египте боролся с инфекционными заболеваниями в качестве директора бактериологической лаборатории при карантинной станции Александрии и инспектора службы здравоохранения Лиги Наций; в Индии

с помощью фаготерапии лечил холеру... С жертвами холеры д’Эрелль принципиально работал не в больнице, организованной по европейским стандартам, а в обычной медицинской палатке в трущобах, так как считал, что бактериальные инфекции надо изучать там, где они возникают, а не в стерильных условиях. В результате д’Эреллю и его команде удалось добиться почти восьмикратного снижения смертности от этого тяжелейшего бактериального заболевания.

В 1928 г. д’Эрелль совершил триумфальное научное турне по США, где прочел цикл лекций в Стэндфордском университете (его дискуссия на тему бактериофагии была опубликована в виде отдельной монографии), а затем занял постоянную должность в Йельском университете – одном из старейших и самых знаменитых научно-образовательных учреждений США.

В это время в Париже успешно работала созданная д’Эреллем частная лаборатория по производству фагов, которой руководил его зять. В 1933 г. туда вернулся и сам д’Эрелль – уже маститым ученым, отмеченным престижными научными званиями и наградами, такими как медаль Левенгука, которая присуждается лишь один раз в десять лет. Этим отличием был в свое время удостоен и кумир д’Эрелля – великий Пастер, который, кстати, также не получил никакого формального медицинского или биологического образования. В эти годы д’Эрелль, как уже упоминалось, был неоднократно номинирован на Нобелевскую премию, хотя ни разу так и не пришел к «финишу».

Почему же успешный западный ученый, находящийся в зените своей славы, вдруг обратил свой взгляд «на Восток»? В 1930-е гг. во Франции набирала силу коммунистическая партия, и отношение к Советскому Союзу было той лакмусовой бумажкой, которой проверялись политические деятели и правительства, сменявшие друг друга у кормила власти. Но помимо «просоветских» симпатий и беспокойного характера д’Эрелля одной из главных побудительных причин поездки в СССР стали его тесные отношения с грузинским микробиологом Г.Г. Элиавой.

«Я нужен Грузии!»

Этот период жизни д’Эрелля, о котором он будет старательно умалчивать до конца своих дней в противовес многочисленным воспоминаниям о научных экспедициях по всему свету, кратко, но метко охарактеризовал американский микробиолог Д.Ч. Дакворт: «Его огненный гений, к несчастью, материализовался окончательно в ии, куда д’Эрелль приезжал несколько раз в течение 1930-х гг., чтобы основать Институт по изучению бактериофага. В течение одного из этих визитов его преданнейший и ближайший помощник, Элиава, был арестован и расстрелян».



Фотография, сделанная в один из приездов Феликса д’Эрелля в Грузию для работы в Институте бактериофагов, которым руководил его давний друг и соратник Г.Г. Элиава. Крайний слева – Георгий Григорьевич Элиава; рядом с ним – г-жа д’Эрелль. Батуми, Грузия, 1934 г.
© Institut Pasteur – Musée Pasteur

Несмотря на фактические неточности, Дакворт был прав по сути. Феликс д’Эрелль тяжело переживал случившееся еще и потому, что будучи старше Элиавы почти на двадцать лет, относился к нему как к сыну.

Элиава – известная грузинская фамилия. Родившейся в обеспеченной семье семейного врача, Гоги с молодых лет отличался свободолобивыми взглядами. Исключенный из Одесского университета за революционную деятельность, он поступил на медицинский факультет университета в Женеве, но из-за Первой мировой войны ему пришлось закончить свое образование

в Москве. Практически прямо со студенческой скамьи он попал на Кавказский фронт в Трапезунд в качестве главы бактериологической лаборатории. Именно там, работая с бактериальными посевами, Элиава в 1917 г. совершенно случайно и независимо обнаружил бактерицидное действие воды р. Кура, сразу верно оценив значимость этого явления. Это произошло как раз в тот год, когда д’Эрелль обнаружил свое знаменитое открытие, и стало ясно, что и этот феномен может быть объяснен действием холерного бактериофага.

Они встретились в Париже в Институте Пастера, куда Элиава неоднократно приезжал, начиная с 1918 г., чтобы работать бок о бок с первооткрывателем бактериофагии. Но на предложение навсегда остаться в Париже молодой ученый и патриот ответил просто: «Я нужен Грузии».

При поддержке д’Эрелля Элиава организовал в Тифлисе (с 1936 г. – Тбилиси) первую в СССР лабораторию по изучению бактериофагов, которая в 1923 г. была преобразована в Институт бактериофагов. Мечта ученых – создание в Грузии международного центра фаговой терапии со своей производственной базой

Священный Ганг. © Creative Commons

Когда были открыты бактериофаги, возник вопрос: не в них ли заключается причина особых свойств воды Ганга? И действительно, к 1980-м гг. в священной реке были найдены вирусы-«пожиратели» клебсиеллы и сальмонеллы, а также кишечной палочки, холерного вибриона и возбудителя бактериальной дизентерии, причем оказалось, что «ассортимент» бактериофагов отличается в разных частях реки (Мухерджи и др., 1984). А вот «естественного врага» такого «популярного» возбудителя, как золотистый стафилококк, в Ганге не обнаружилось.

Исследования показали, что свои особые свойства вода из Ганга сохраняет гораздо дольше, чем думали английские моряки, чье путешествие длилось несколько месяцев. Вода из Ганга демонстрировала антимикробную активность в отношении штамма кишечной палочки спустя годы хранения: так, в воде восьмилетней «выдержки» эти микробы выживали хуже, чем в воде кипяченой или фильтрованной; и даже вода, простоявшая 16 лет, по этим свойствам «обгоняла» кипяченую (Наутиял и др., 2008).

И все же лекарством воду из Ганга считать нельзя: помимо бактериофагов в ней содержатся бактерии, в том числе патогенные, а также бытовые и промышленные отходы. Это, однако, не мешает верующим употреблять ее для питья и отправления обрядов. Благодаря Интернету «святую воду» можно заказать в любую точку земного шара. В продаже есть вода как из самого Ганга, так и из других священных индийских рек – Годавари, Джамны, Нармады и др. К примеру, бутылочка воды объемом 50 мл обойдется в 1 доллар США.

Деньги на продаже святой воды зарабатывают не только приверженцы индуизма, но и христиане: в сети можно встретить предложения купить воду из Иордана или же «святую воду с благословением Папы Римского». А вот воду из священного для мусульман колодца Замзам в Мекке в продаже не найти: власти Саудовской Аравии запретили вывозить ее за пределы страны. Кстати, эту воду в свое время протестировал сам Ханкин, выяснив, что против холеры она бессильна. Впоследствии было показано, что она может помочь от изжоги, но в 2011 г. выяснилось, что эта «святая» вода содержит много мышьяка, нитраты и потенциально опасные бактерии. Священная река христиан – Иордан, также не может похвастаться чистотой, к тому же содержит много солей. Впрочем, верующие всего мира не останавливаются перед подобными «мелочами», и потоки желающих приобщиться к святыням не иссякают.

М. С. Кошелева (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск)

ВИРУС «СВЯТОСТИ»

Во многих религиях воде приписывают чудесные свойства, и самым полноводным источником такой влаги, бесспорно, является Ганг – одна из самых больших равнинных рек Южной Азии. Еще в XIX в. англичане, возвращаясь из Индии, брали в дорогу воду из этой великой реки, правда, в первую очередь по утилитарным соображениям: вода из Ганга таинственным образом не портилась в пути и много дней «оставалась сладкой и свежей» (Холлик, 2007). Тогда это и впрямь походило на чудо.

Первым секрет святой воды из Ганга решился раскрыть англичанин Э. Ханкин, опубликовавший в «Анналах института Пастера» статью «Бактерицидная активность вод Джамны и Ганга в отношении холерного микроба» (1896). Он показал, что автоклавированная вода из Ганга никак не действовала на холерный вибрион, но в воде фильтрованной или нефилтрованной содержалось «нечто, убивавшее холеру». Противомикробные свойства воды подтверждал и тот факт, что холера не распространялась вниз по течению, хотя по индуистскому обычаю в священную реку сбрасывали тела умерших (в том числе и от холеры), дабы покойники обрели там последнее пристанище. Исследовав образцы, взятые из Ганга за пределами города и в его границах, Ханкин обнаружил, что количество холерных вибрионов на выходе из города увеличивается, но не намного. Ученый также отметил, что полусожженные трупы, выброшенные в реку, сохранялись на удивление хорошо – в Темзе они разложились бы гораздо быстрее.



Семья Элиава – Георгий, его супруга Амелия и приемная дочь Ганна – около парижского Дома инвалидов, где похоронен Наполеон Бонапарт, горячим поклонником которого был Элиава. Фото из архива Н. Девдариани (Тбилиси, Грузия)

и экспериментальными клиниками – стала быстро претворяться в жизнь благодаря поддержке Серго Орджоникидзе, тогдашнего наркома тяжелой промышленности. В течение ряда лет д'Эрель поставлял в институт оборудование и библиотечные материалы, преимущественно за свой счет, а в 1933–1935 гг. сам приезжал в Тифлис, где, также безвозмездно, проработал в течение двух полугодий. Виртуозно владея всеми лабораторными навыками, включая стеклодувные работы, он проводил исследования со своим обычным фанатизмом с утра и до позднего вечера, никогда не выказывая усталости.

В это время полным ходом шло строительство и оборудование нового здания института, а на территории институтского парка был возведен двухэтажный «французский» коттедж на две семьи, предназначенный для д'Эреля и Элиавы. Очевидно, на первых порах д'Эрель планировал окончательно переехать в Грузию и даже посвятил Сталину свою новую книгу «Бактериофаг и феномен выздоровления», переведенную на русский язык Элиавой и опубликованную в 1935 г. Однако, по-видимому, к этому времени д'Эрель уже избавился от иллюзий и начал отдавать себе отчет о реальном положении дел в стране «всеобщей справедливости

и равенства», в том числе о жестокой борьбе за власть, которая существовала внутри самой компартии. В любом случае, после своего внезапного отъезда в 1935 г. он больше не возвращался на берега Куры, хотя продолжал поддерживать институт оборудованием. Таким образом ему посчастливилось избежать репрессий последующих лет, которым подверглись иностранные специалисты, обвиненные в шпионаже.

К ближайшему соратнику д'Эреля судьба оказалась не столь милостива: в 1937 г. Элиава был арестован по приказу Л. П. Берии, который в то время был Первым секретарем компартии Грузии, и обвинен в шпионаже

Амелия Станиславовна Воль-Левецкая-Элиава. Родилась в Варшаве в 1885 г., расстреляна в 1937 г. как жена «врага народа». Реабилитирована посмертно.

Фото из архива Н. Девдариани (Тбилиси, Грузия). Публикуется впервые





А. С. Воль-Левицкая-Элиава – примадонна Тифлисского театра оперы и балета. Фото из архива Н. Девдариани (Тбилиси, Грузия). Публикуется впервые

Георгий была лишь одна оперная певица – его жена Амелия (сценическое имя Мелания) Воль-Левицкая-Элиава. С этой красавицей-полькой, ставшей любовью всей его жизни, Георгий познакомился задолго до описанных событий.

Амелия Воль родилась в Варшаве, образование получила в Лондоне, а позднее вышла замуж за своего профессора Н. Левецкого. Обладая прекрасным сопрано и превосходной техникой, в 1910—1912 гг. она блистала на сцене варшавской оперы в ведущих сольных партиях. По отзывам прессы, у нее было все: «голос необыкновенной красоты, оживленный чувством и большой долей темперамента», «отличные внешние данные: женское изящество, одухотворенное лицо и прекрасный рост».

В 1913 г. у Амелии родилась дочь, а еще через два года семья, спасаясь от тягот Первой мировой войны, переехала в Россию. Она с успехом выступала сначала в Киеве, а затем на сцене Тифлисского театра оперы и балета – центра грузинской музыкальной культуры.

В 1918 г. 33-летняя примадонна познакомилась с 26-летним Гоги Элиавой, который был известным меломаном и не пропускал ни одного ее выступления, однако встретились они у общих знакомых случайно. По словам Н. Девдариани, только невероятная настойчивость Элиавы заставила ее бабушку развестись с мужем и спустя два года связать свою жизнь с блестящим грузинским бактериологом.

Эти события их жизни – как главы романа. Сначала были письма: Элиава уехал в командировку в Париж в Пастеровский институт. Потом переписка прервалась, что было обычным делом в годы гражданской войны, а командировка затянулась. Собираясь вернуться

на родину, в Польшу, Амелия с дочерью отправилась в Батуми, чтобы сесть на корабль. В одно прекрасное утро они увидели на палубе парохода, прибывшего из Марселя, Гоги, усиленно размахивающего шляпой – он был уверен, что Амелия пришла встречать его. Больше они не расставались...

В 1937 г. супруги Элиава были арестованы. Очевидно, немалую роль в этом действительно сыграл Берия, в лице которого Элиава нашёл себе смертельного врага еще до открытия Института бактериофага, когда он послал докладную Сталину через голову Берии. К тому же Гоги, личность яркая и горячая, никогда не стеснялся в выражениях, когда сталкивался с ограниченностью и несправедливостью, – свидетелем ожесточенных споров Элиавы с Берией был сам д'Эрелль.

Что касается «женского вопроса», то Берия мог действительно приревновать Элиаву к жене его друга Тинатин Джикии, работавшей в библиотеке Института бактериофага. За этой голубоглазой красавицей с точеными чертами лица, музой художников и поэтов Тифлиса, Берия, по слухам, безуспешно ухаживал долгие годы. По словам внучки ученого, их пути пересеклись в больничной палате Тинатин, куда навестить ее с букетами одновременно пришли Элиава и Берия... По воспоминаниям Тинатин, ее муж получил анонимку, где сообщалось, будто она изменяет ему с Элиавой, и супруги сразу увидели в этом руку Берии.

Осенью 1936 г. гидростроителю В. Джикии предъявили сфабрикованное обвинение в измене родине. Позднее он был расстрелян как враг народа, а на следующий год в лагерную ссылку отправилась и сама Тинатин.

Супруги Элиава были расстреляны 26 июля 1937 г. Несмотря ни на что, они прожили счастливую, пусть и недолгую жизнь, и умерли в один день...

в пользу французского правительства и попытке распространения эпидемии. 9 июля 1937 г. на закрытом заседании Верховного Суда Грузинской ССР он вместе с другими «национал-уклонистами», входящими в «троцкистский шпионско-вредительский центр», был приговорен к смерти.

26 июля того же года Элиава был расстрелян. Его жена разделила судьбу мужа, а ее единственная двадцатичетырехлетняя дочь Ганна, удочеренная Элиавой, была отправлена в пятилетнюю ссылку в Казахстан.

Ирония судьбы: после расстрела Элиавы «французский коттедж», который должен был стать счастливым домом для семей двух выдающихся микробиологов, перешел в распоряжение грузинской КГБ и был «оцеплен» высокой железной оградой.

Когда мечты не сбываются

О том, как д'Эрелль воспринял известие о смерти своего «преданнейшего и ближайшего» помощника и друга, мы можем только гадать. Его положение в Париже к этому времени пошатнулось, хотя в сотрудничестве с Институтом Пастера и Институтом радия ему наконец удалось доказать, что бактериофаг является вирусом, поставив точку в своем многолетнем споре с Нобелевским лауреатом Ж. Борде, отстаивавшем ферментную природу бактериофага (убеждения последнего были основаны на его выдающемся открытии феномена скрытой вирусной инфекции у бактерий).

Родоначальнику фаговой терапии, во-первых, не простили его работу на коммунистический режим, во-вторых, применение на практике препаратов из бактериофагов, производством которых в 1920—1930-х гг. занялись многие частные фирмы, зачастую не оправдывало ожиданий. Плохая воспроизводимость результатов лечения фагами во многом определялась техническими проблемами, к тому же многие врачи и предприниматели имели очень слабое представление о микробиологии и самих основах биологического знания. Доходило до смешного: когда однажды д'Эрелль испытал два десятка коммерческих препаратов бактериофагов, оказалось, что ни один из них не содержит активных вирусов!

Ошибочная диагностика, неправильные методы приготовления, консервирования, хранения и применения препаратов, отсутствие надлежащего контроля за лечением... Список подобных упущений можно продолжить, и все они подтачивали авторитет фаговой терапии, отражаясь на инвестициях в эту область.

Вторую мировую войну Феликс д'Эрелль встретил в Париже, где вместе с женой и дочерьми занялся производством лекарств для союзных армий. После оккупации Парижа в 1940 г. из-за отказа наладить производство бактериофага для лечения раневых инфекций у немецких военнослужащих ученый, к тому времени перешагнувший семидесятилетний рубеж, находился под домашним арестом вплоть до освобождения французской столицы в 1944 г.

Спустя еще пять лет основоположник бактериофагологии скончался, практически в полном забвении, от рака поджелудочной железы и был похоронен в окрестностях французской столицы. Кстати сказать, через год умер и соавтор открытия бактериофагов – Ф. Туорт, лаборатория которого была взорвана в годы войны.

...и умерли в один день

Существует много предположений и слухов относительно причин, которые привели к гибели Г. Г. Элиавы – директора тбилисского Института бактериофагов и ученого с мировым именем. И одно из них – его взаимоотношения с Л. П. Берией, также выходцем из Западной Грузии, с которым Георгий, по слухам, был в приятельских отношениях (некоторые даже считали их школьными товарищами, несмотря на семилетнюю разницу в возрасте). Бытует легенда, что антагонизму между ними немало способствовал любовный треугольник: «плейбой» Элиава влюбился в оперную актрису польского происхождения, которая гастролировала в Грузии и которой оказывал внимание сам Лаврентий Павлович.

Но, судя по имеющимся сведениям и воспоминаниям внучки Элиавы, Натальи Девдариани, в жизни





Георгий Григорьевич Элиава (1892—1937)

БАКТЕРИОЛОГ НИКОЛКА БУЛГАКОВ

Одним из соратников Ф. д'Эрелля был не кто иной, как Николай Афанасьевич Булгаков, брат знаменитого писателя и прототип юнкера Николки Турбина из его романа «Белая гвардия». После Крымской эвакуации юнкер Булгаков попал в Югославию, где блестяще закончил Загребский университет, подрабатывая то санитаром в бараках для больных черной оспой и сыпным тифом, то запевалой в студенческом оркестре балалаечников. После окончания университета он был оставлен при кафедре бактериологии, где вместе с доктором В. Сертичем заинтересовался недавно открытыми вирусами-бактериофагами.

На работу приятелей обратил внимание д'Эрелль, который создал в Париже лабораторию по изучению и производству препаратов бактериофага, и молодые исследователи стали его сотрудниками. Как вспоминал сам профессор, однажды он прислал из Лондона культуру стрептококков с поручением найти соответствующий бактериофаг. Через две недели работа была выполнена, для чего, по словам д'Эрелля, «надо было быть Булгаковым, с его способностями и точностью методики».

Булгаков занимался не только выделением новых природных рас бактериофага, но и разработкой аппаратуры для автоматического стерильного заполнения сразу нескольких сотен ампул. В 1936 г. Булгаков заменил д'Эрелля в Мексике, где за полгода не только организовал бактериологическую лабораторию и наладил систему преподавания, но и освоил испанский язык, на котором начал читать лекции. Во время немецкой оккупации его арестовали как югославского подданного и отправили в лагерь в качестве заложника, где Булгаков работал врачом, помогая другим узникам. Его участие в движении Сопротивления было отмечено орденом Югославии

Элиава расстрелян, д'Эрелль умер... После Второй мировой войны большинство ученых и врачей начали забывать о бактериофагах: идею д'Эрелля об универсальном «живом» бактериологическом оружии практически «убило» открытие новой легенды XX в. – антибиотиков. Но не в СССР: Институт бактериофагов, который после гибели его основателя был объединен с Институтом микробиологии и эпидемиологии, действительно превратился в ведущий (и единственный!) мировой центр терапевтических исследований фогов. Во время Великой Отечественной войны бактериофаги широко применялись для лечения ран и предотвращения эпидемий кишечных заболеваний.

В последующие десятилетия производство целевых фогов и фоговых «коктейлей» в СССР успешно развивалось: тонны таблеток, жидких препаратов и аэрозольных баллонов, содержащих тщательно подобранные смеси фогов для терапии и профилактики, каждый день отправлялись в разные концы огромной советской территории. Бактериофаги использовались в стационарах, их можно было купить как по врачебным рецептам, так и в свободной продаже. В тбилисском институте, которому в 1988 г. было присвоено имя его основателя, работало около 1200 человек, а в его «музее» – крупнейшей библиотеке бактериофагов в мире, хранилось более 3000 вирусных клонов, в том числе из парижской коллекции д'Эрелля. В конце 1980-х гг. в Тбилиси было создано НОП «Бактериофаг» с производственными площадками в Уфе, Хабаровске и Горьком (Нижнем Новгороде). Производство бактериофагов было организовано также в странах социалистического лагеря – Польше и Чехословакии.

Тем не менее еще долгое время мировое научное сообщество относилось к «пожирателям бактерий» как к не очень удобной («советской») замене антибиотикам, пока в конце прошлого века перед человечеством во весь рост не встала глобальная медицинская проблема лекарственной устойчивости бактерий, развязавших настоящую «гонку вооружений». Но это уже совсем другое время, другие герои и другая история...

Из предисловия к книге «Бактериофаг и феномен выздоровления» (1935) почетного профессора факультета естественных наук Тифлисского государственного университета Ф. д'Эрелля, переведенной на русский язык Г. Элиавой:

«Работников науки можно разделить: на философов (нередко, предтеч реального знания) и ученых в тесном смысле этого слова, терпеливо, камень за камнем складывающих величественное здание экспериментальной науки.

Но «экспериментальный» не означает еще «непогрешимый»: и опыт может вести по ложному пути; лишь достигнутый результат является верховным мерилем правильности или ошибочности избранного экспериментального приема. Для лица, посвятившего свою жизнь экспериментальной медицине, таким результатом должно быть: довести до минимума сумму физических страданий человека, для борца, посвятившего свое существование науке об общественном развитии, целью служит: довести до кульминационного пункта благосостояние и счастье всего человечества <...>

И в одном и в другом случае лишь практический результат может непреложно установить правильность намеченного пути...»

Редакция благодарит Б.А. Рыжикова (НПО «Микроген», Москва), Н. Девдариани (Тбилиси, Грузия) и Музей Пастера (Париж, Франция) за помощь в подготовке публикации


 Феликс д'Эрелль.
© Institut Pasteur – Musée Pasteur

Литература
 Земская Е.А. Михаил Булгаков и его родные: Семейный портрет. М.: Языки славянской культуры. 2004. 360 с.
 Лысогоров Н.В. Когда отступает фантастика. Серия Эврика. М.: Молодая гвардия. 1968. 256 с.
 Шраер-Петров Д.П. Охота на рыжего дьявола. Роман с микробиологами. Азбука. 2010. 400 с.
 Bacteriophages, Part B. 2012. Ed. Szybalski W. T., Loboocka M. Advances in Virus Research. Academic Press. V. 83. 496 p.
 Summers W.C. Félix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. New Haven and London, Yale University Press. 1999. 230 p.

Фаги атакуют

Отечественная история производства и применения бактериофагов

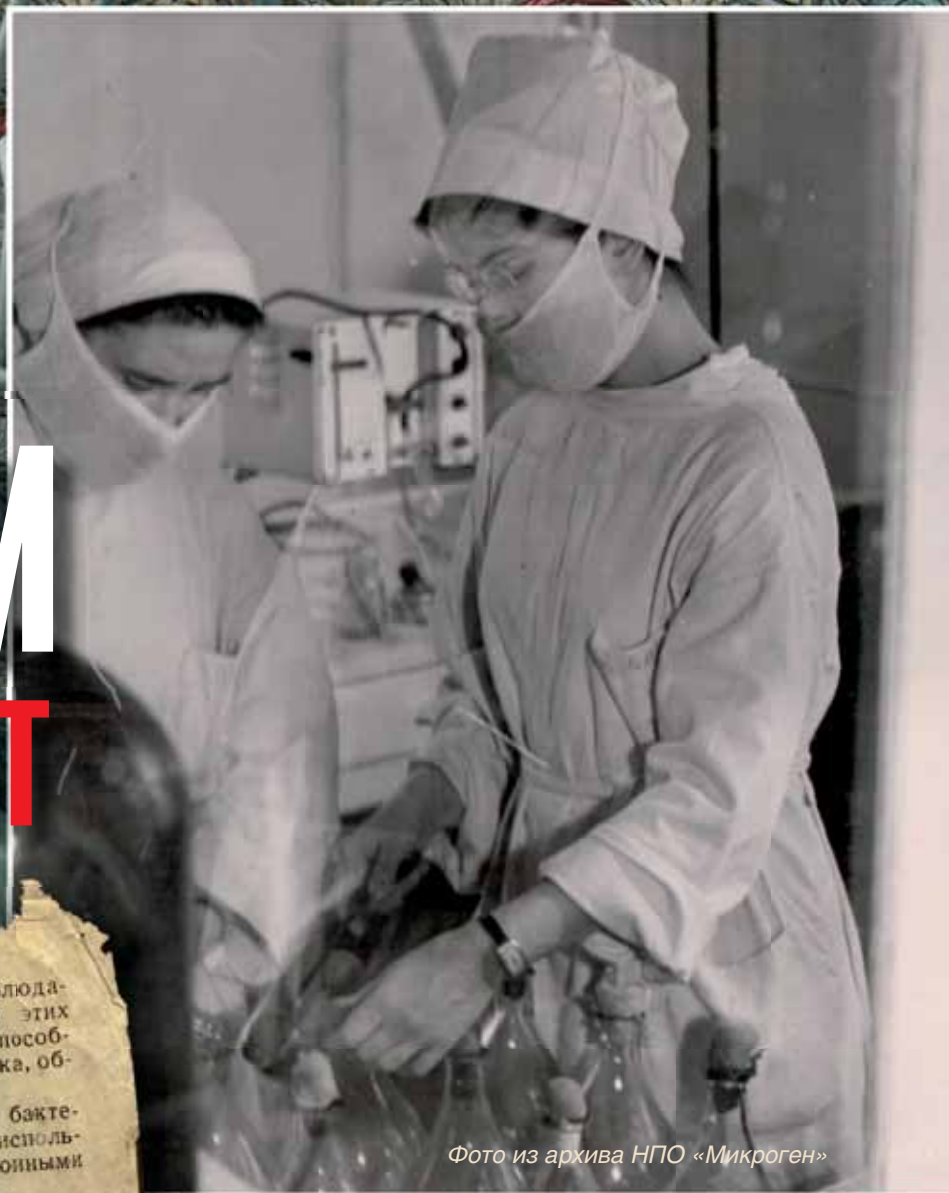


Фото из архива НПО «Микроген»

В нашей стране бактериофаги для нужд медицины производятся и применяются уже почти 80 лет: еще во время Великой Отечественной войны с их помощью удалось спасти жизнь тысячам раненых и предотвратить эпидемию холеры в осажденном Сталинграде перед знаменитой Сталинградской битвой. Появление и широкое распространение антибиотиков практически свело «на нет» производство бактериофагов в мире, поэтому в течение десятилетий СССР оставался единственной страной, где технологии производства фаговых препаратов не только продолжали развиваться, но были поставлены на промышленную основу. И сегодня Россия остается мировым лидером по выпуску и терапевтическому применению этих эффективных и безопасных антибактериальных средств

А. Н. ДАБИЖЕВА, Т. В. ПРИСАДА, М. Г. ЕФИМОВА, Н. Н. ВОРОШИЛОВА

ПРЕПАРАТОВ
БАК

1942 г.
СТАЛИНГРАД -
БАКТЕРИОФАГИ ПОБЕДИЛИ ХОЛЕРУ
З. В.Ермольева
1898-1971



Благодаря сотрудничеству двух великих ученых-микробиологов – француза Феликса д'Эрелля и грузина Георгия Элиавы – в СССР в 1920-х гг. был создан первый и единственный в мире научно-исследовательский центр бактериофагологии. Несмотря на репрессии, в результате которых его первый директор Г. Г. Элиава был расстрелян, а часть сотрудников отправлены в ссылку, тбилисский Институт бактериофагов выстоял и продолжил свою работу, став ведущим мировым центром терапевтических исследований и производства этих бактериальных «киллеров».

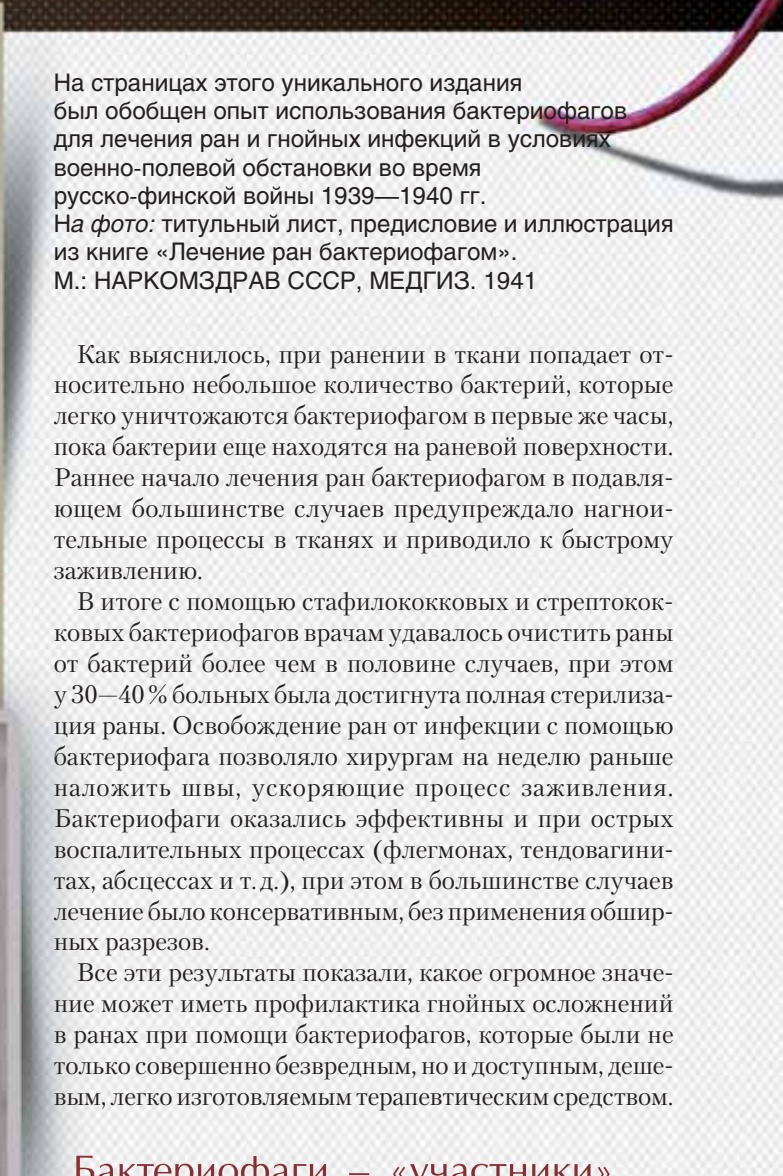
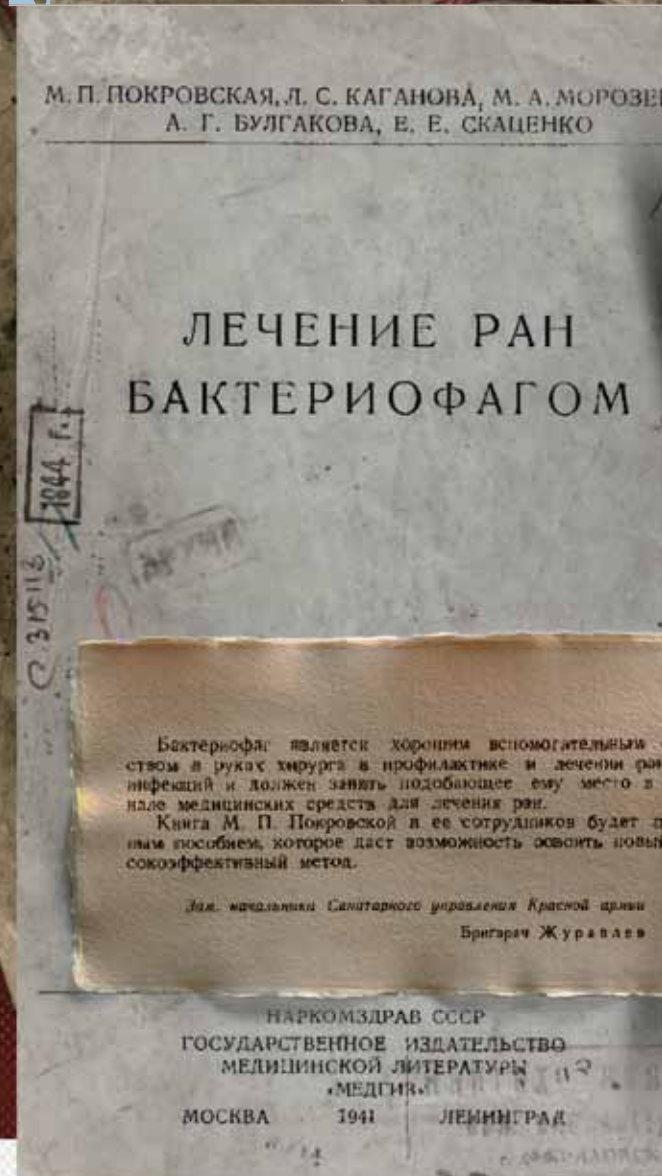
Бактериофаги советского производства были впервые массово использованы в экстренных ситуациях, вызванных вспышками бактериальных инфекций в конце 1930-х гг. Так, в 1938 г. в нескольких районах Афганистана, граничащих с территорией СССР, разразилась эпидемия холеры. Чтобы предупредить распространение этого тяжелейшего бактериального заболевания, было решено использовать на пограничных территориях холерный бактериофаг. Фаговый препарат давали местному населению, добавляли в колодцы и водоемы.

Ключевые слова: фаговая терапия, холерный бактериофаг, лечение ран, Сталинградская битва, НПО «Микроген».
Key words: phage therapy, choleraic bacteriophage, treat for injuries, battle of Stalingrad, Research and Production Association "Microgen"

Слева направо:
ПРИСАДА Татьяна Валерьевна – к. м. н., начальник цеха бактериофагов Нижегородского предприятия по производству бактериальных препаратов «ИмБио» (Нижний Новгород), филиала НПО «Микроген»;
ЕФИМОВА Марина Георгиевна – к. м. н., начальник отделения бактериофагов Пермского НПО «Биомед» (Пермь), филиала НПО «Микроген»;
ДАБИЖЕВА Александра Николаевна – к. м. н., начальник отдела маркетинга и продвижения НПО «Микроген» Минздрава России (Москва);
ВОРОШИЛОВА Наталья Николаевна – д. м. н., начальник цеха производства препаратов бактериофагов предприятия «Иммунопрепарат» (Уфа), филиала НПО «Микроген»

В итоге на советской территории не было зарегистрировано ни одного случая заболевания холерой. Но настоящую серьезную проверку бактериофаги прошли во время войны с Финляндией в 1939–1940 гг. Как известно, до открытия антибиотиков вопрос о судьбе раненого во время военных действий часто зависел от того, присоединится ли к ранению инфекция. Комплексная бригада из 11 человек, среди которых были хирурги, бактериологи и лаборанты, начала применять препараты бактериофагов, созданные и произведенные в тбилисском институте для спасения раненых на войне с белофиннами.

© А. Н. Дабиджева, Н. Н. Ворошилова,
Т. В. Присада, М. Г. Ефимова



«Массовое изготовление бактериофага для практических целей требует чрезвычайно большого внимания, тщательности и глубокой теоретической подготовки со стороны бактериолога, организующего данное производство. Выделенные бактериофаги необходимо тщательно изучить, прежде чем пустить в производство. Терапевтическое значение могут иметь только активные бактериофаги, удаивающие число корпускул приблизительно за 10 минут, что является критерием высокой вирулентности данной расы бактериофага. Бактериофаг должен растворять подавляющее большинство штаммов бактерий данного вида, выделенных из самых разнообразных источников и из различных местностей. Бактериофаг должен обладать хорошей жизнеспособностью. Его необходимо выращивать на свежесделанных из организма бактериальных штаммах, наименьшее число раз перевитых на искусственных питательных средах.

Имея в виду значительные отличия индивидуальных свойств различных рас бактериофагов, для терапевтического употребления следует готовить смесь из нескольких вирулентных рас того или иного бактериофага. После изготовления бактериофага необходимо его тщательно проконтролировать. Контроль должен обеспечить высокое качество выпускаемого препарата, его стерильность и полную безвредность при введении в организм. Ампулы, употребляемые для разлива бактериофага, должны быть из лучших сортов стекла, не выделяющих щелочи, иначе со временем pH жидкости изменится, и бактериофаг может погибнуть. При правильном изготовлении бактериофага в производстве, проведенном на самом высоком научном уровне, в руки медицинских работников дается ценнейшее оружие для борьбы с различными инфекционными заболеваниями» (Покровская и др., 1941)

На страницах этого уникального издания был обобщен опыт использования бактериофагов для лечения ран и гнойных инфекций в условиях военно-полевой обстановки во время русско-финской войны 1939—1940 гг. На фото: титульный лист, предисловие и иллюстрация из книги «Лечение ран бактериофагом». М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1941

Как выяснилось, при ранении в ткани попадает относительно небольшое количество бактерий, которые легко уничтожаются бактериофагом в первые же часы, пока бактерии еще находятся на раневой поверхности. Раннее начало лечения ран бактериофагом в подавляющем большинстве случаев предупреждало нагноительные процессы в тканях и приводило к быстрому заживлению.

В итоге с помощью стафилококковых и стрептококковых бактериофагов врачам удавалось очистить раны от бактерий более чем в половине случаев, при этом у 30—40% больных была достигнута полная стерилизация раны. Освобождение ран от инфекции с помощью бактериофага позволяло хирургам на неделю раньше наложить швы, ускоряя процесс заживления. Бактериофаги оказались эффективны и при острых воспалительных процессах (флегмонах, тендовагинитах, абсцессах и т. д.), при этом в большинстве случаев лечение было консервативным, без применения обширных разрезов.

Все эти результаты показали, какое огромное значение может иметь профилактика гнойных осложнений в ранах при помощи бактериофагов, которые были не только совершенно безвредным, но и доступным, дешевым, легко изготавливаемым терапевтическим средством.

Бактериофаги – «участники» Сталинградской битвы

Дальнейшая история фаговой терапии с связана с трагическими событиями Великой Отечественной войны 1941—1945 гг. Именно в эти годы, в условиях тотальной нехватки антибактериальных препаратов (на начало войны в СССР еще не было своего пенициллина) было принято решение о налаживании массового производства бактериофагов для лечения инфекций у бойцов Красной Армии.

Особое внимание было направлено на наработку фагов, уничтожающих бактерии, вызывающие кишечные инфекции (холеру, брюшной тиф, дизентерию, сальмонеллез), что было связано с неизбежной

На первых этапах развития промышленного производства фаговых препаратов бактериофаги выращивались в больших стеклянных емкостях – бутылках и трехлитровых «четвертях»

и поэтому время от времени запасы бактериофага нужно повторно проверять, чтобы для практической работы всегда давать только высококачественный препарат.

ПРЕПАРАТЫ БАКТЕРИОФАГА, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Для лечения хирургических заболеваний в СССР изготавливаются различные бактериофаги: стафилококковый, стрептококковый, синегнойный, энтерококковый, бактериофаги против кишечной палочки, против возбудителей газовой гангрены и др. Эти бактериофаги употребляются в тех случаях, когда бактериологическое исследование точно установило вид микроорганизма, обуславливающего данный инфекционный процесс. В тех случаях, когда бактериологическое исследование не произведено или процесс вызывается несколькими видами микроорганизмов, д'Эрель предложил применять смеси из бактериофагов, не дожидаясь постановки точного бактериологического диагноза. Смеси бактериофагов дают возможность в практической обстановке применить бактериофаг немедленно. Д'Эрель предлагает в хирургической практике употреблять смесь из стафилококкового, стрептококкового, паракишечного, энтерококкового, протейного и синегнойного бактериофагов. Эту смесь д'Эрель назвал пиофагом.

При применении пиофага в больном организме «работают» (лизируют) только те бактериофаги, которые встретились с соответствующими их литической специфичности бактериями, обуславливающими данное заболевание. Остальные бактериофаги, имеющиеся в смеси, остаются инактивными; никакого вреда организму они не принесут и через некоторый небольшой срок будут выделены из организма.

При отсутствии готового пиофага можно самим сделать смесь из имеющихся в распоряжении хирурга бактериофагов. Желательно составлять смеси таким образом, чтобы не включать в них лишние бактериофаги. Например, бактериологическими исследованиями установлено, что в первые часы после ранения из аэробных микробов в ране чаще всего обнаруживаются стрептококки и стафилококки. Протей и синегнойная палочка появляются в ранах значительно позже. Поэтому лечение свежих ран можно производить смесью из стрептококкового и стафилококкового бактериофагов, не включая в нее протейного и синегнойного. Нужно иметь в виду, что в очень сложных случаях происходит, по нашим наблюдениям, ослабление отдельных компонентов, что снижает лечебные качества препарата. Подробно об этом сказано ниже, в

18

Как показал опыт русско-финской войны, применение бактериофагов для лечения ран давало возможность хирургам на неделю раньше наложить швы, ускоряющие процесс заживления. На фото: страницы из книги «Инструкции по методам хирургического лечения». М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1942.

в полевых условиях антисанитарией. Чуть позже в госпиталях стали применять и бактериофаги против раневых инфекций, так хорошо зарекомендовавшие себя во время русско-финской войны. Применение этих препаратов позволяло сократить до недели пребывание раненого солдата в полевом госпитале. Всего же за годы войны предприятия, созданные на базе советских бактериологических институтов, изготовили для фронта более 200 тыс. литров «раневых» бактериофагов!

Но на этих производствах не только выпускались тонны лекарственных препаратов – полным ходом шла научная работа. Дело в том, что питательные микробиологические среды изготавливались на основе мяса, которого в годы войны и так не хватало. Поэтому параллельно производству в краткие сроки проводились научные изыскания по поиску новых сред, которые научились готовить из плаценты, казеина и даже кровяных сгустков.

Именно бактериофаги (а конкретно – холерный бактериофаг) стали одним из залогов успеха знаменитой Сталинградской битвы, решающего сражения Второй мировой войны. Дело в том, что холера всегда была неизбежным спутником воюющих армий: так, еще во время Севастопольской кампании 1854–1955 гг. англо-французские войска потеряли в результате военных действий 73 тыс. человек, а от холеры – 18 тыс.! Под Сталинградом летом 1942 г. холера дала о себе знать на территории, занятой

ЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГА

Мы могли убедиться, что Московский институт имени Мечникова и Тбилисский институт бактериофагии изготавливают препараты высокого качества (табл. 1).

Таблица 1

Лизирующая активность бактериофагов in vitro по отношению к микроорганизмам, выделенным из ран (в %)

Вид бактерий	Лизировано	Не лизировано
Гемолитические стафилококки	68,8	31,2
Негемолитические	50	50
Гемолитические стрептококки	84,5	15,5
Протей	50	50
Синегнойная палочка	24	76
Энтерококки	50	50

литической активности бактериофагов сделан на основании исследований. Это дает материал для оценки качества бактериофагов, предназначенных для лечения хирургическими инфекциями. В графе «Лизировано» учтены только случаи полного лизиса. Лизис менее отчетливый на



Эта счетно-фасовочная машина для упаковки препаратов бактериофагов была сконструирована сотрудниками завода в г. Горький (ныне Нижний Новгород)



В СССР была реализована оригинальная идея изготовления комплексного препарата фагов, который ее автор – сам Феликс д'Эрель, назвал «пиофагом» (от «пио» – гнойный). Смысл соединения в один препарат нескольких разновидностей бактериофагов, действующих на разные бактерии, заключался в расширении «боевого спектра действия» лекарства. Это было особенно важно в случае ранений, так как в травмированный участок попадают самые разные бактерии, и проводить экстренную профилактику и лечение уже нагноившихся ран лучше всего с помощью разных бактериофагов. Этот же принцип позднее лег в основу создания комбинированных российских препаратов на основе «кишечных» фагов – «интести-бактериофагов», которые и в наши дни активно используются для массовой профилактики и лечения кишечных инфекций



Утверждаю
Начальник Санитарного управления
Красной армии
врач Е. И. Смирнов
6.VII.1941 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПРИМЕНЕНИЮ БАКТЕРИОФАГА В ХИРУРГИИ

Общие сведения

Препарат бактериофага представляет собой прозрачную массу, содержащую бактериофаг, обладающий способностью уничтожать патогенные микробы. Кроме бактериофага в жидкости содержатся безвредные для организма коагуляционные продукты растворения тех микробов, из которых выделен препарат.

Бактериофаг выпускается в ампулах или герметически закрытых флаконах. На этикетке приводится название бактерии, указывающее, против каких бактерий действует дан-

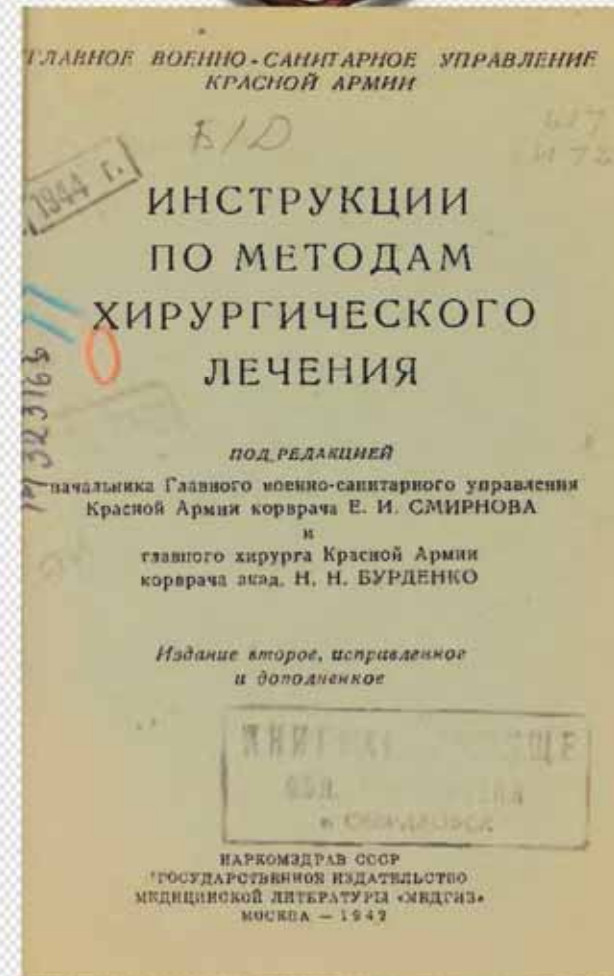
ный препарат. Для применения в хирургической практике следующие препараты: стафилококковый, протейный, синегнойный, колифаг и бактериофаг 4 возбудителей анаэробной инфекции (бацилла пастереллы, вибрион септик, гистолитикус) как по отдельности.

Выпускается также препарат, называемый «кокцидий» из смеси нескольких бактериофагов. Этот препарат преимущественно стафило- и стрептококковый. В состав бактериофага не входят возбудители тифа, брюшного тифа, дизентерии и других инфекций. Фаги против возбудителей тифа и дизентерии не входят. Фаги против возбудителей тифа и дизентерии не входят. Фаги против возбудителей тифа и дизентерии не входят.

Бактериофагом перед употреблением следует убедиться, что его содержимое должно оставаться

Как свидетельствует эта инструкция для практикующих врачей-хирургов, изданная в начале Великой Отечественной войны, к этому времени бактериофаги стали признанным антибактериальным средством и рекомендовались для использования в хирургической практике при лечении ран и острых инфекционно-воспалительных процессов. На фото: титульный лист и предисловие к книге «Инструкции по методам хирургического лечения». М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1942

Главный хирург Красной армии академик Бурденко



немецкими войсками. С одной стороны, она была неожиданным союзником, с другой – прямой угрозой, так как эпидемия не признает линию фронта.

Чтобы оценить опасность, в Сталинград была откомандирована профессор З. В. Ермольева из московского Всесоюзного института экспериментальной медицины, уже имевшая опыт работы с бактериофагами в военных условиях. (Кстати сказать, именно Ермольева в том же 1942 г. получила первый советский пенициллин – *крустозин ВИЭМ*, который стали активно применять в военных госпиталях к концу Великой Отечественной войны.)

Для получения холерных вибрионов требовался «материал» – трупы умерших от холеры. И тогда в Берлин полетели полные недоумения депеши: из немецких полевых лазаретов стали пропадать трупы военнослужащих – их похищали и доставляли за линию фронта советские полковые разведчики. Но холерные вибрионы, отправленные на завод в г. Горький (Нижегород), оказались ослабленными и не годились для культивации промышленных бактериофагов. Поэтому на заводе была проведена большая работа по заражению

кроликов и выращиванию необходимых патогенных бактерий и их бактериофагов. К сожалению, эшелон с полученным с таким трудом фаговым препаратом разбомбила немецкая авиация. Поэтому Ермольева прямо в осажденном Сталинграде организовала подземную тайную лабораторию по производству холерного бактериофага, который ежедневно получали около 50 тыс. человек!

В конце 1942 г. Зинаиде Виссарионовне позвонил сам Главнокомандующий И. В. Сталин и задал жизненно важный вопрос: «Не опасно ли держать под Сталинградом более миллиона людей, и не помешает ли планам командования эпидемия холеры?». Бактериолог ответила, что на своем фронте она победу одержала – теперь слово за Красной Армией.

Вот так в СССР было положено начало массовому применению бактериофагов, причем в тот момент, когда весь мир перешел на антибиотики, открытые британским ученым А. Флемингом еще в 1928 г.

Новейшая история

После войны отечественная история бактериофагов продолжилась: вплоть до сегодняшнего дня препараты бактериофагов успешно производят на российских предприятиях, выпускающих иммунобиологические препараты.

В настоящее время НПО «Микроген» – крупнейшее предприятие Минздрава России – производит 14 препаратов, содержащих бактериофаги к самым распространенным возбудителям бактериальных инфекций. Их используют для профилактики и лечения острых кишечных инфекций – дизентерии, брюшного тифа, сальмонеллезов, а также для лечения гнойно-септических и других заболеваний различной локализации: хирургических инфекций, заболеваний уха, горла, носа, легких и плевры, урогенитальной патологии, гастроэнтероколитов, дисбактериоза кишечника, а также инфекционных заболеваний новорожденных и детей первого года жизни. Выпускаются препараты на трех заводах объединения, созданных на базе микробиологических институтов: в Уфе – с 1939 г., в Горьком – с 1941 г., и в Перми – с 1995 г.

Конечно, со времен Великой Отечественной войны технология выращивания бактериофагов была значительно усовершенствована: создана реакторная технология культивирования, оптимизированы среды для выращивания. Особое внимание было уделено очистке бактериофагов от балластных составляющих, для чего сейчас используется *ультрафильтрация*, что увеличивает безопасность препаратов.

Современное российское производство бактериофагов – беспрецедентное в мире по своим масштабам. Бактериофаги выпускают как полноценные лекарственные препараты, и сегодня в нашей стране



Глубинное выращивание бактериофага в реакторах – важный этап в развитии производства фагов.



ежегодно используется более 1 млрд упаковок этого противобактериального средства. Однако лишь в 2016 г. бактериофаги – спустя столетие после их открытия! – были внесены в официальную российскую фармакопею.

Один из последних примеров массового применения российских бактериофагов в качестве профилактического средства – использование их в регионах, пострадавших от наводнения.

Так, в 2013 г. около 70 тыс. доз *интести-бактериофага*, действие которого направлено против широкого спектра бактерий, вызывающих заболевания желудочно-кишечного тракта, было доставлено в районы Дальнего Востока. А в 2014 г. в районы Алтайского края и Республики Хакасия отправилось более 8 тыс. упаковок этого препарата, а также дизентерийного и сальмонеллезного бактериофагов.

Таким образом, препараты бактериофагов были и остаются одним из быстрых средств реагирования на бактериальную угрозу в самые трагические и кризисные моменты для нашей страны. Культура производства и применения этих противомикробных средств, сохраненная благодаря творческому и самоотверженному труду отечественных ученых, приобретает особую ценность в условиях стремительно нарастающей бактериальной устойчивости к антибиотикам.

Важным этапом в развитии производства бактериофагов стало создание технологии глубинного культивирования в реакторах-ферментерах (слева). Этот метод, позволяющий менять состав питательной среды в широком интервале, добиваясь максимального выхода целевого продукта с минимальным использованием ручного труда, и сегодня с успехом применяется на предприятиях НПО «Микроген» (вверху).

Литература

Покровская М.П., Каганова Л.С., Морозенко М.А. и др. *Лечение ран бактериофагом*. М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1941. 57 с.

Инструкция по методам хирургического лечения. М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1942. 216 с.

В публикации использованы иллюстративные материалы из архива НПО «Микроген», из книг «Лечение ран бактериофагом». 1941; «Инструкция по методам хирургического лечения». 1942

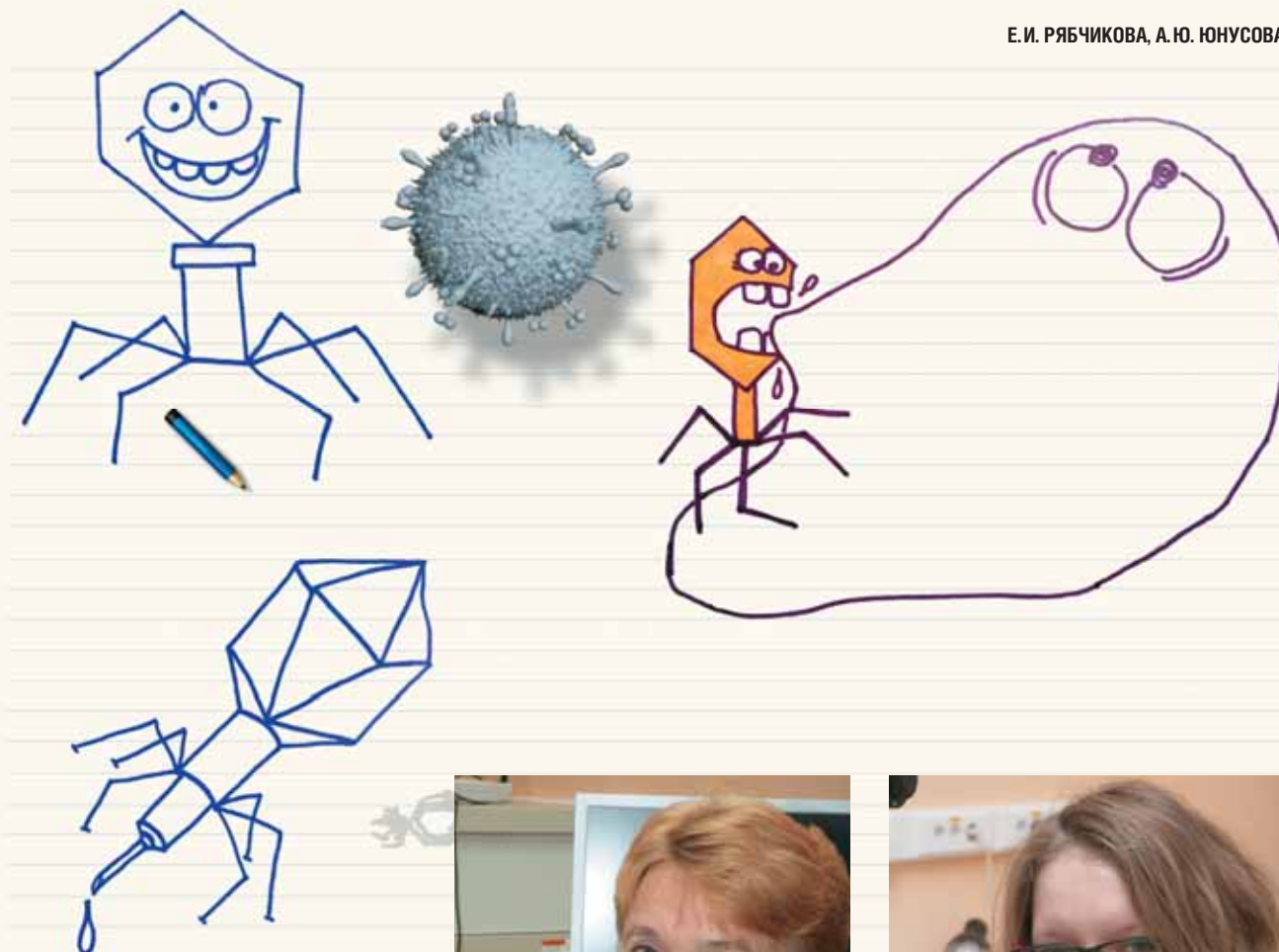
Редакция благодарит Б.А. Рыжикова (ФГУП НПО «Микроген», Москва) за помощь в подготовке публикации



Бактериофаг, мы тебя видим!



Прошло сто лет с того времени, как английский микробиолог Ф. Туорт отметил прозрачные стекловидные пятна в колониях микрококков, где погибли бактериальные клетки. После открытия бактериофагов их исследования долгое время носили феноменологический характер из-за недостаточного развития экспериментальных методов. Ученые не имели возможности детально изучить особенности противобактериального воздействия бактериофагов, так как последние нельзя увидеть не только невооруженным глазом, но и с помощью светового микроскопа. Изучение вирусов, в том числе вирусов бактерий, вышло на принципиально новый уровень лишь с созданием и внедрением в научную практику электронного микроскопа



Так выглядят нитевидные бактериофаги после негативного контрастирования фосфорновольфрамовой кислотой в поле зрения электронного микроскопа Jet 1400 (JEOL, Япония)

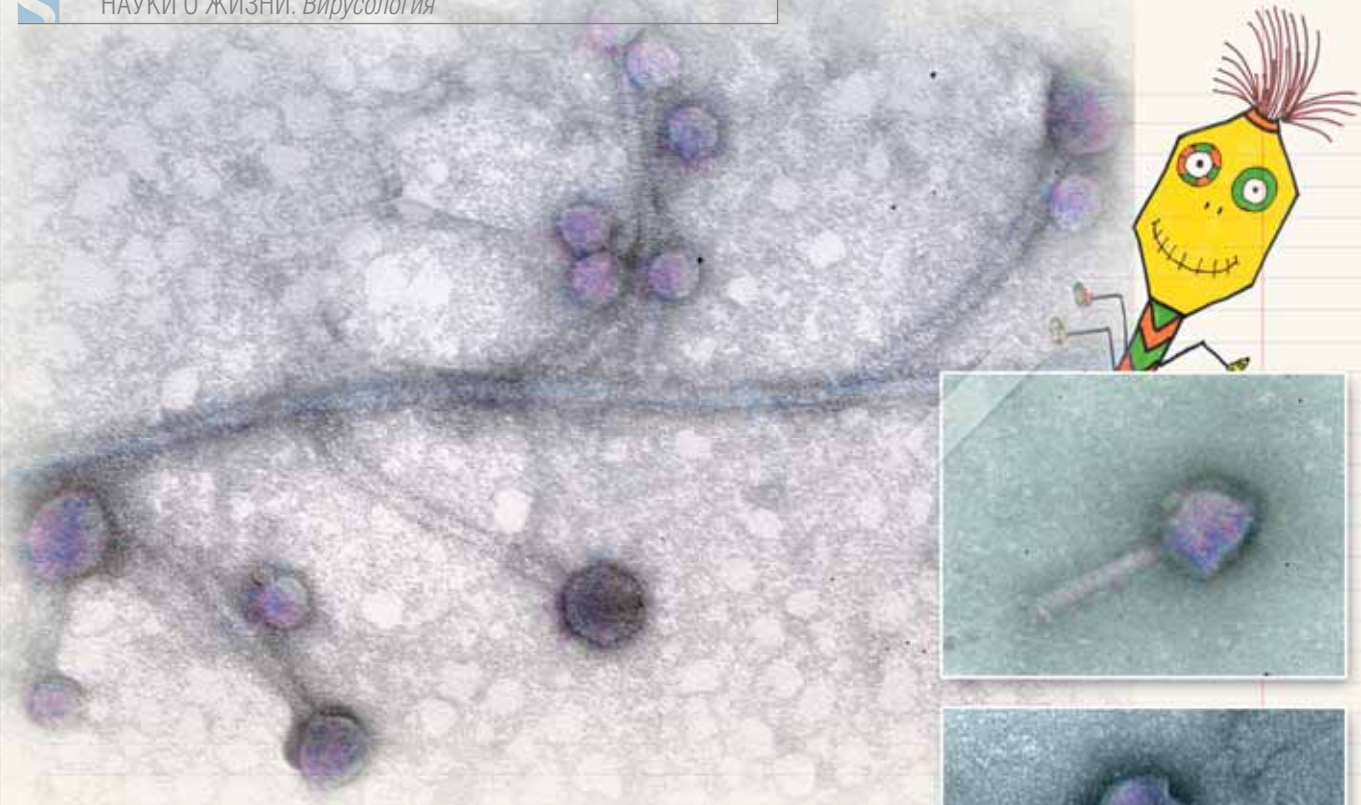


РЯБЧИКОВА Елена Ивановна – доктор биологических наук, заведующая группой микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной биологии СО РАН (Новосибирск), доцент кафедры биомедицинской физики и кафедры молекулярной биологии Новосибирского государственного университета. Автор и соавтор более 150 научных работ

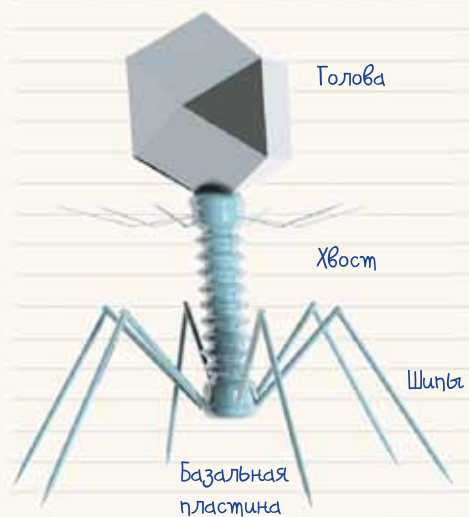
ЮНУСОВА Анастасия Юрьевна – аспирант группы микроскопических исследований Института химической биологии и фундаментальной биологии СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 4 научных работ

Ключевые слова: бактериофаги, вирусы бактерий, морфология, электронная микроскопия.
Key words: bacteriophages, bacteria viruses, morphology, electron microscopy

© Е. И. Рябчикова, А. Ю. Юнусова



Методом негативного контрастирования хорошо выделяются разные морфологические формы бактериофагов. Например, в суспензии, полученной на основе клеточной культуры бактерии *Proteus mirabilis*, видны фаги разного размера, с «хвостом» и бесхвостые (вверху). Справа: бактериофаги разной формы в смыве с кишечника индюшки

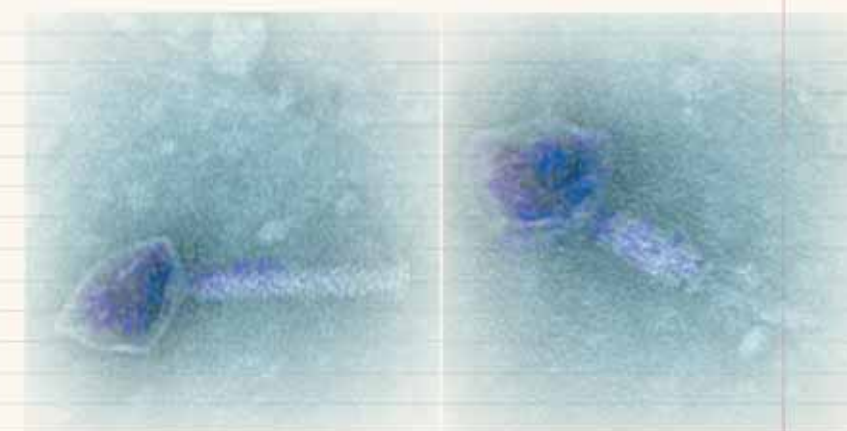


Типичный бактериофаг состоит из «головы», где содержится ДНК или РНК, окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой (капсидом), и «хвоста» — белковой трубки, которую вирус использует для «инъекции» генетического материала в бактериальную клетку

С появлением электронной микроскопии стало понятно, что бактериофаги являются даже не микро- а наноорганизмами, так как их размеры не превышают 100 нм. Также выяснилось, что по своему строению они отличаются колоссальным разнообразием. Соответственно, возник вопрос об их номенклатуре. В основу первой классификации, которая была предложена еще в 1943 г., легли особенности строения фагов, установленные с помощью электронной микроскопии. Один из ее основоположников, Э. Руска, в своей общей схеме классификации вирусов выделил бактериофаги отдельно, разделив их на три типа по морфологическим характеристикам (Ackermann, 2009).

В основу современной систематики бактериофагов, созданной в 1967 г., легла классификация, включавшая шесть морфотипов. Но по мере открытия новых бактериофагов в нее включались все новые семейства, роды и виды. С развитием методов молекулярной биологии появились дополнительные критерии классификации, учитывающие тип нуклеиновой кислоты и (или) композицию белков в составе фага.

В соответствии с решением Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) бактериофагами называют вирусы, специфически инфицирующие клетки бактерий и архей. Определение видовой принадлежности бактериофагов проводят на основе комплекса признаков, в который обязательно входит форма и размеры вирусного капсида, тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), слагающей геном, наличие/отсутствие оболочки



Несокращенный «хвост»

Сокращенный «хвост»

Применение в исследованиях бактериофагов современных молекулярных методов позволило выявить множество особенностей этих интересных организмов. Бактериофаги в свою очередь оказались для молекулярных биологов очень полезным методологическим инструментом (Brussow, 2013).

Была бы голова, а хвост будет

Бактериофаги, по сути, устроены сравнительно просто: каждый такой вирус представляет собой комплекс нуклеиновой кислоты и белков, упакованных особым образом. Форма их может быть причудлива, однако около 96% всех известных бактериофагов имеют «хвостатый» фенотип (Matsuzaki *et al.*, 2005). У них имеется «голова» икосаэдрической формы (белковый резервуар, где упакована нуклеиновая кислота) и «хвост» — белковая структура, где расположены элементы, способные прочно связываться с рецепторами (особыми белками или полисахаридами) на поверхности бактерии. Разные виды «хвостатых» бактериофагов различаются размерами «головы», размером и тонкой структурой «хвоста».

Чтобы узнать вид бактериофага, нужно определить его ультраструктурные характеристики, для

«Хвост» бактериофагов может быть разной длины и структуры: длинный, гибкий и несокращенный «хвост» — признак фагов семейства Siphoviridae, короткий — Podoviridae. А представители семейства Myoviridae обладают жестким, способным к сокращению «хвостом», отделенным от «головы» своеобразной «шейкой» (вверху)

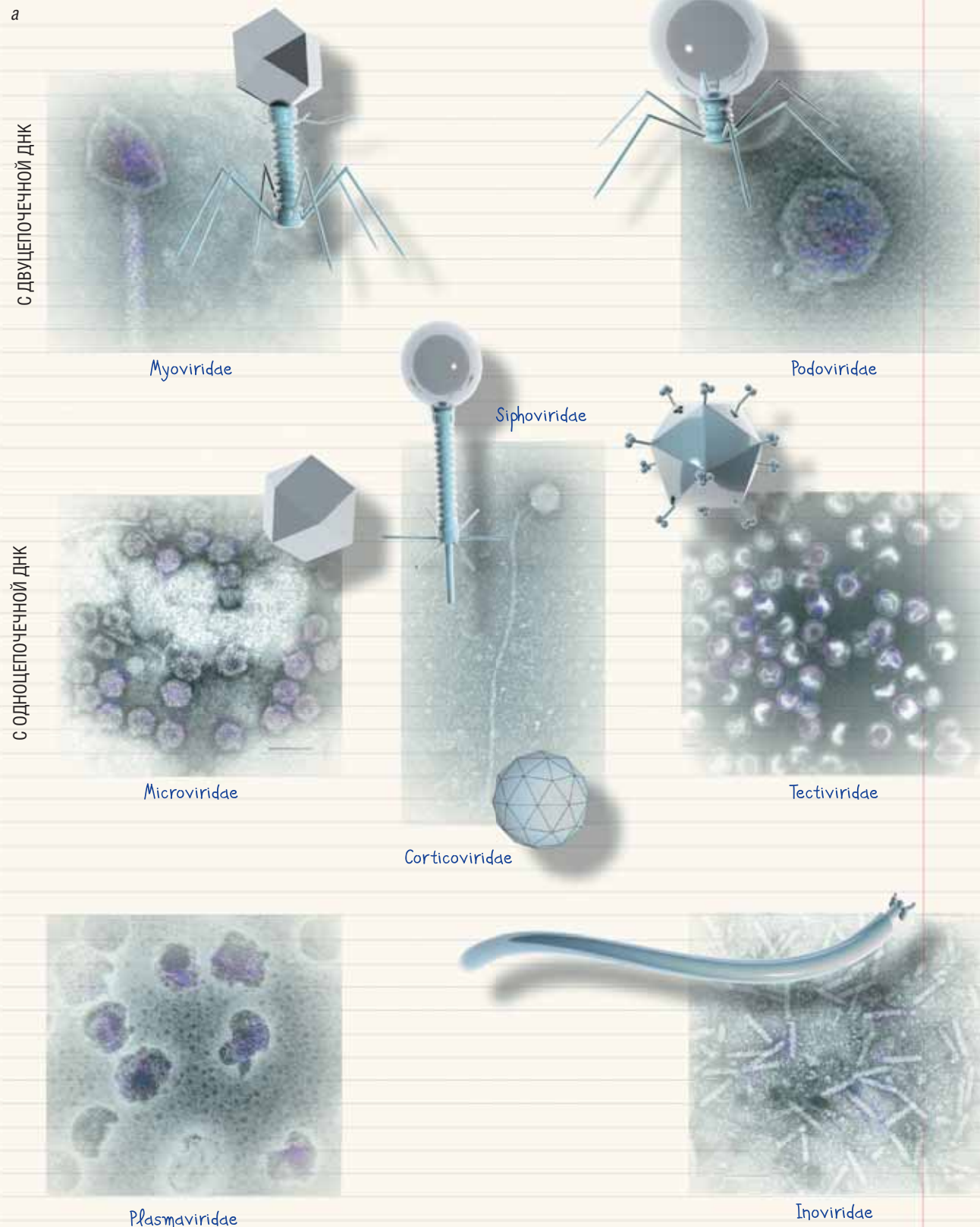
чего используют метод негативного контрастирования. Образцом может служить любая взвесь, содержащая фаги: вода из природного источника, смывы с кишечника животных или суспензия бактериальных клеток после инкубации с бактериофагом в условиях лаборатории. На каплю подготовленной суспензии помещают специальную медную сетку, покрытую тонкой полимерной пленкой, на которую и сорбируются бактериофаги. Затем сетку обрабатывают контрастирующим веществом (обычно уранилацетатом или фосфорно-вольфрамовой кислотой), которое окружает частицы бактериофага и создает темный фон, на котором бактериофаги, имеющие низкую электронную плотность, становятся видны в электронном микроскопе.

На сегодняшний день с помощью электронной микроскопии описано свыше 6,3 тыс. бактериофагов (Ackerman & Tiekotter, 2012; Ackermann & Prangishvili, 2012). Оказалось, что далеко не у всех бактериофагов можно четко выделить «голову» и «хвост», а что касается их наследственного материала, то наиболее часто встречаются фаги с двуцепочечной ДНК. Систематика бактериофагов очень динамична, поскольку регулярно обнаруживаются новые фаги (Ackermann, 2007).

Охота на бактерию

Совершенствование методов электронной микроскопии позволило визуализировать не только сами бактериофаги, но и процесс их размножения. Наиболее детально исследован процесс проникновения в клетку «хвостатых» бактериофагов, описаны молекулярные механизмы «впрыскивания» фаговой ДНК в цитоплазму бактериальной клетки (Guerrero-Ferreira & Wright, 2013).

Типичное поведение бактериофага при «нападении» на бактерию можно проследить на примере лизирующего фага. Сначала фаг прикрепляется к поверхности бактерии, используя ее рецепторы в качестве «якоря». Затем его «хвост» с помощью специальных белков внедряется в бактериальную стенку — образуется «канал», по которому нуклеиновая кислота фага вбрасывается в клетку. В течение следующего получаса в клетке бактерии



с ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

с ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Myoviridae

Podoviridae

Siphoviridae

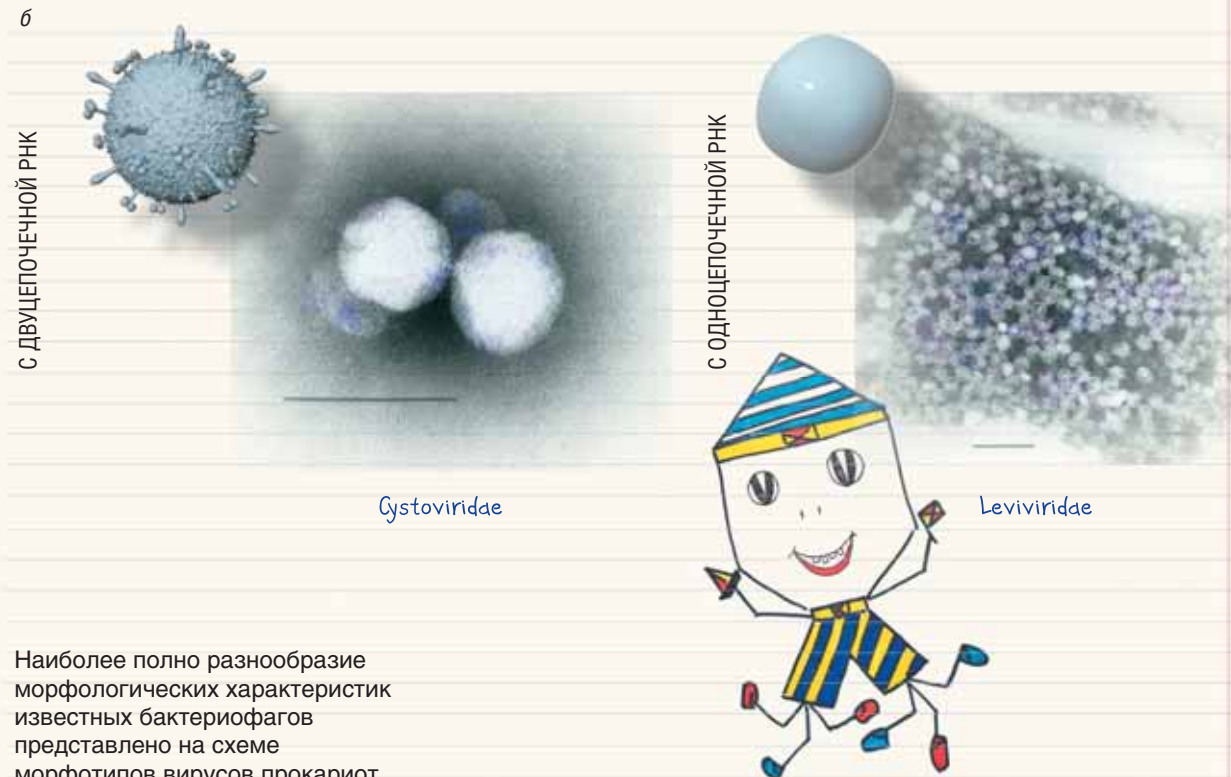
Microviridae

Tectiviridae

Corticoviridae

Plasmaviridae

Inoviridae



с ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК

с ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК

Cystoviridae

Leviviridae

Наиболее полное разнообразие морфологических характеристик известных бактериофагов представлено на схеме морфотипов вирусов прокариот, разработанной Г. Аккерманном. На ней представлено 10 семейств вирусов бактерий и 11 семейств вирусов архей. Схема учитывает основные таксономические признаки фагов – форму капсида и тип нуклеиновой кислоты, ДНК (а) или РНК (б) (Ackermann, 2007). «Голова» бактериофагов, как правило, симметрична и имеет шестиугольный контур. Бактериофаг может быть лишен «хвоста», но при этом иметь дополнительную оболочку, как у представителей семейства Corticoviridae, а отсутствие «головы» – типичный признак семейства Inoviridae, объединяющего «нитчатые» бактериофаги.

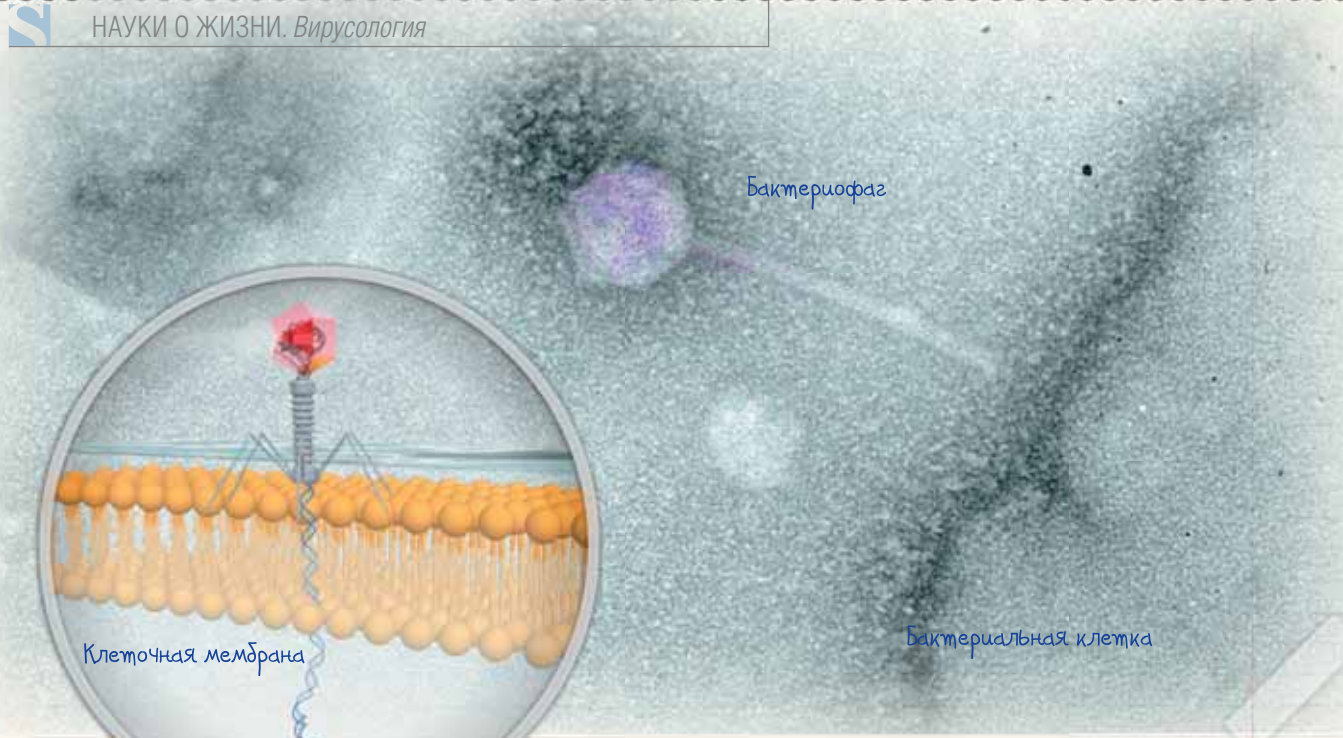
Царство прокариот (доядерных организмов) подразделяется, как известно, на бактерий и архей. Представители этих подцарств отличаются друг от друга структурой клеточной стенки, особенностями жизнедеятельности и степенью устойчивости к факторам внешней среды (большая часть архей обитает в экстремальных условиях). Несмотря на небольшое число выделенных видов вирусов архей, их морфологическое разнообразие уже сейчас превосходит разнообразие фагов бактерий. Среди них встречаются и типичные для последних «хвостатые» формы, однако подавляющее большинство археофагов имеют уникальные морфотипы. Среди них – вирионы в виде «эллипсоида» веретенообразной, капельной и бутылочной формы, бесхвостые или с двумя хвостами, сферические и палочковидные вирионы и т. п. При этом обнаруженное морфологическое разнообразие вирусов архей представляет собой, вероятно, лишь верхушку айсберга.

Уникальные характеристики археофагов наряду с существованием трех «клеточных линий» на планете – бактерий, архей и эукариот (ядерных организмов) – свидетельствуют о наличии трех специфических вирусных «доменов», образовавшихся в результате долгой совместной эволюции вирусов и их «хозяев», хотя некоторые из этих вирусов сохранили следы их общего происхождения (Pina *et al.*, 2011)

* При методе ультратонких срезов клетки заливают в особую смолу, и из получившихся твердых блоков готовят срезы толщиной 60–80 нм на ультрамикротоме с помощью стеклянного или алмазного ножа

происходит синтез белковых и нуклеиновых компонентов фагов и сборка новых фаговых частиц. После этого клетка разрушается, освобождая зрелые вирионы.

Сочетание методов негативного контрастирования и ультратонких срезов* позволяет проследить все этапы воспроизводства бактериофагов, включая сорбцию частиц фага на поверхности бактериальных клеток, их проникновение в клетки и копирование. К сожалению, эта область исследований разработана существенно хуже, чем визуализация и идентификация



Бактериофаг

Бактериальная клетка

Клеточная мембрана

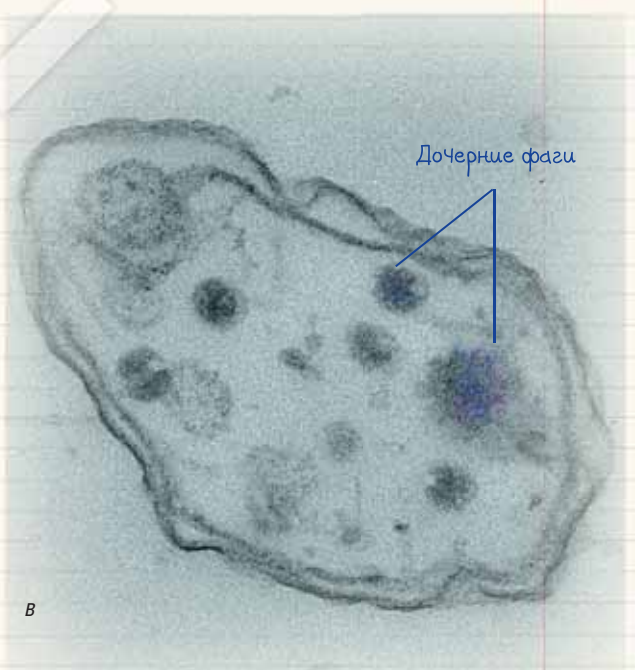
а

Эти фотографии иллюстрируют основные этапы репродукции бактериофага семейства *Mioviridae* в клетках бактерий (а). На ультратонких срезах инфицированной бактериальной клетки видны вирусные частицы, как сорбированные на поверхности клетки, так и находящиеся в цитоплазме (б). Результат заражения фагом – гибель бактериальной клетки, цитоплазма которой лизирована и содержит дочерние фаги (в)



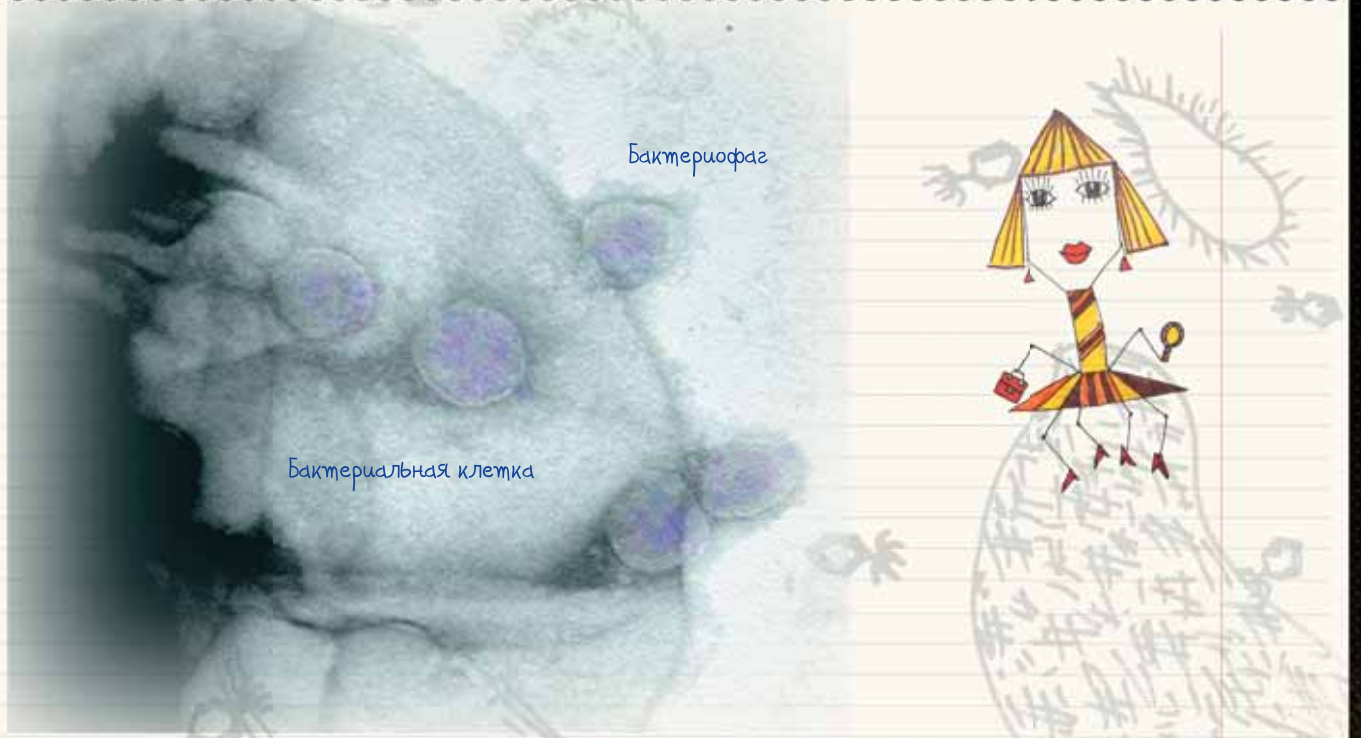
Бактериофаг

б



Дочерние фаги

в



Бактериофаг

Бактериальная клетка

Сорбция на поверхности бактериальной клетки «короткохвостых» частиц фагов семейства *Podoviridae*, которые прикрепляются к клетке с помощью небольших белковых субъединиц

бактериофагов методом негативного контрастирования. Между тем ультраструктурные характеристики каждого из этапов жизненного цикла бактериофагов могут быть полезны для адекватной оценки эффективности разрабатываемых методов фаговой терапии.

Лутература
 Ackermann H. W., Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. 2012. N. 157. P. 1843–1849.
 Ackermann H. W., Tiekotter K. L., Murphy's law – if anything can go wrong, it will // Bacteriophage. 2012. N. 2:2. P. 122–129.
 Bacteriophages methods and protocols / Ed. A. M. Kropinski, R. J. Clokie. Humana Press, 2009. V. 1.
 Duckworth D. H. Who discovered bacteriophage? // Bacteriological reviews. 1976. V. 40. N. 4. P. 793–802.
 Introduction: a short history of virology // Viruses and man: a history of interactions / Ed. M. W. Taylor. Springer, 2014. P. 1–21.
 Krylov V. N. Phage therapy in terms of Bacteriophage genetics: hopes, prospects, safety, limitation // Rus. J. of genetics. 2001. V. 37. N. 7. P. 869–887.
 Matsuzaki S., Rashed M., Uchiyama J., et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases // J. Infect. Chemother. 2005. N. 11. P. 211–219.

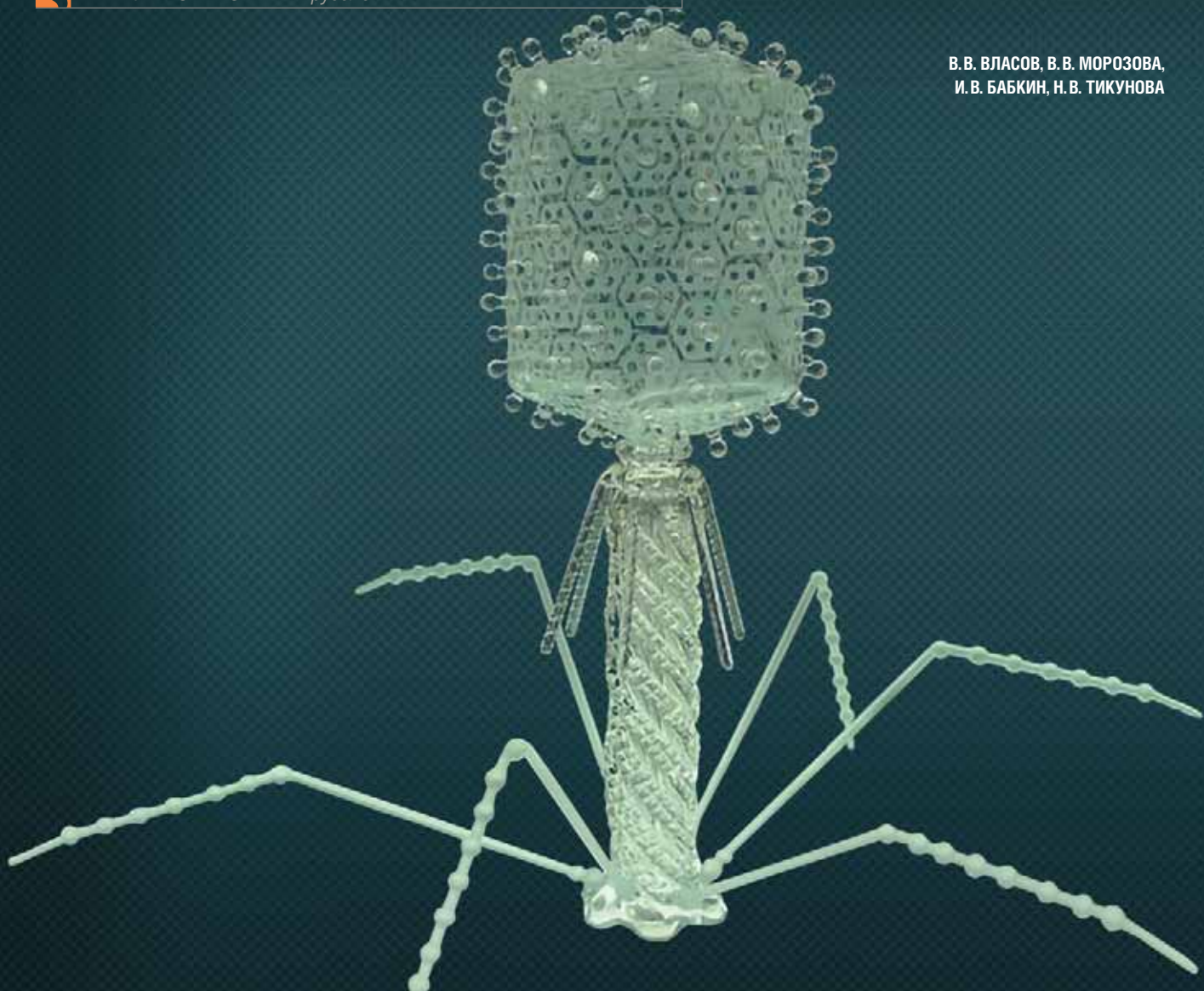
Бактериофаги, несомненно, представляют собой уникальное явление на нашей планете: с одной стороны, они просто устроены, с другой – характеризуются колоссальным разнообразием как своей морфологии, так и своих потенциальных «жертв».

Для нас эти микроорганизмы не только безопасны, но и «дружественны», так как способны убивать патогенные бактериальные клетки, не затрагивая при этом клетки высших организмов, включая человека, а также сельскохозяйственных животных или растений. Это свойство позволяет использовать бактериофаги для терапии бактериальных инфекций, следуя принципу «враг моего врага – мой друг».

Перспективность фаговой терапии определяется не только самим фактом уничтожения бактерий фагами, но и высокой специфичностью взаимодействия фаг-«хозяин». Наконец, поскольку речь идет о природном феномене, человек может воздействовать на патогенные бактерии, не применяя вредные химические агенты.

В публикации использованы фото авторов и рисунки Жени Власова

В. В. ВЛАСОВ, В. В. МОРОЗОВА,
И. В. БАБКИН, Н. В. ТИКУНОВА



БАКТЕРИОФАГИ: 100 ЛЕТ НА СЛУЖБЕ ЧЕЛОВЕЧЕСТВУ

В середине прошлого века биологическая наука сделала революционный шаг вперед, установив молекулярные основы функционирования живых систем. Огромную роль в успешных исследованиях, которые привели к определению химической природы наследственных молекул, расшифровке генетического кода и созданию технологий манипуляций генами, сыграли бактериофаги, открытые еще в начале прошлого столетия. На сегодняшний день эти бактериальные вирусы освоили много полезных для человека «профессий»: их используют не только как безопасные антибактериальные препараты, но и как дезинфектанты и даже в качестве основы для создания электронных наноустройств

На фото: один из самых изученных вирусов – бактериофаг Т4, поражающий кишечную палочку. Стекло. Галерея Люка Джеррама

Когда в 1930-х гг. группа ученых занялась проблемами функционирования живых систем, то в поиске простейших моделей они обратили внимание на *бактериофаги* – вирусы бактерий. Ведь среди биологических объектов нет ничего проще, чем бактериофаги, к тому же их можно легко и быстро выращивать и анализировать, а вирусные генетические программы невелики.

Фаг – это самая маленькая природная структура, содержащая плотно упакованную генетическую программу (ДНК или РНК), в которой нет ничего лишнего. Эта программа заключена в белковую оболочку, снабженную минимальным набором устройств для ее доставки внутрь бактериальной клетки. Бактериофаги не могут размножаться сами по себе, и в этом смысле их нельзя считать полноценными живыми объектами. Их гены начинают работать только в бактерии, используя имеющиеся в бактериальной клетке биосинтетические системы и запасы молекул, необходимых для синтеза. Однако генетические программы этих вирусов принципиально не отличаются от программ более сложных организмов, поэтому эксперименты с бактериофагами позволили установить основополагающие принципы устройства и работы генома.

В дальнейшем эти знания и разработанные в ходе исследований методы стали фундаментом для развития биологической и медицинской науки, а также широкого спектра биотехнологических приложений.

Ключевые слова: бактериофаг, фаготерапия, ферменты, фаговый дисплей, наноматериалы.

Key words: bacteriophage, phage therapy, enzymes, phage display, nano materials



ВЛАСОВ Валентин Викторович – академик РАН, доктор химических наук, профессор, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор более 300 научных работ и 20 патентов



МОРОЗОВА Вера Витальевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор более 30 научных работ и 6 патентов



БАБКИН Игорь Викторович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 58 научных работ и 2 патентов



ТИКУНОВА Нина Викторовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 120 научных работ и 21 патента

© В. В. Власов, В. В. Морозова, И. В. Бабкин, Н. В. Тикунова, 2016

Бактериофаги – наши друзья, когда речь идет о бактериях, патогенных для человека. Однако есть и другие, дружественные нам бактерии, которые используются в современных биотехнологических производствах, а также в традиционных производствах пищевой промышленности, таких как сыроварение и т. п. В этих случаях фаги могут приносить большой вред, поскольку в больших популяциях микроорганизмов, находящихся в стадии интенсивного роста, создаются благоприятные условия для размножения фагов, что приводит к лизису производственных бактериальных культур. При производстве сыра проблема не столь серьезна, так как при этом обычно применяют закваски, состоящие из многих культур, часть которых выдержит фаговую атаку и продолжит процесс молочно-кислого брожения. Серьезные неприятности возникают, если весь процесс основан на применении одного конкретного бактериального штамма, как, например, при производстве антибиотиков или терапевтических белков

Борцы с патогенами

Первые попытки использовать бактериофаги для лечения инфекционных заболеваний были предприняты практически сразу после их открытия, однако недостаток знаний и несовершенные биотехнологии того времени не позволили достичь полного успеха. Тем не менее дальнейшая клиническая практика показала принципиальную возможность успешного применения бактериофагов при инфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, при острых гнойно-септических состояниях больных, для лечения хирургических инфекций и т. д.

По сравнению с антибиотиками бактериофаги имеют ряд преимуществ: они не вызывают побочных эффектов, к тому же строго специфичны для определенных видов бактерий, поэтому при их использовании не нарушается нормальный микробиом человека. Однако такая высокая избирательность создает и проблемы: чтобы успешно лечить пациента, нужно точно знать инфекционный агент и подбирать бактериофаг индивидуально.

Фаги можно использовать и профилактически. Так, Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского разработал профилактический продукт «ФУДФАГ» на основе коктейля из бактериофагов, снижающий риск заражения острыми кишечными инфекциями. Клинические исследования показали, что недельный прием препарата позволяет избавиться от гемолизующей кишечной палочки и других патогенных и условно-патогенных бактерий, вызывающих дисбактериоз кишечника.

Бактериофагами лечат инфекционные болезни не только людей, но и домашних и сельскохозяйственных животных: мастит у коров, колибактериоз и эшерихиоз у телят и свиней, сальмонеллез у кур... Особенно удобно применять фаговые препараты в случае аквакультуры – для лечения промышленно выращиваемых рыб и креветок, так как в воде они долго сохраняются. Бактериофаги помогают защитить и растения, хотя применение фаговых технологий в этом случае затруднено из-за воздействия природных факторов, таких как солнечный свет и дождь, губительных для вирусов.

Фаги могут сыграть большую роль в поддержании микробиологической безопасности продуктов питания, так как применение антибиотиков и химических агентов в пищевой отрасли не решает эту проблему, одновременно снижая уровень экологической чистоты продукции. О серьезности самой проблемы говорят статистические данные: например, в США и России ежегодно регистрируется до 40 тыс. заболевших сальмонеллезом, из которых 1% умирает. Распространение этой инфекции в значительной степени связано с выращиванием, переработкой и потреблением различных видов птицы, и попытки применить для борьбы с ней бактериофаги дали многообещающие результаты.

Так, американская компания *Intralytix* производит фаговые препараты для борьбы с листериозом, сальмонеллезом и бактериальным загрязнением кишечной палочкой. Они разрешены к применению как добавки, предотвращающие размножение бактерий на продуктах питания, – их распыляют на продукты из мяса и домашней птицы, а также на овощи и фрукты. Эксперименты показали, что коктейль из бактериофагов может быть успешно применен и при транспортировке и реализации живой прудовой рыбы для снижения бактериального загрязнения не только воды, но и самой рыбы.

Очевидным применением бактериофагов является *дезинфекция*, т. е. уничтожение бактерий в тех местах, где их не должно быть: в больницах, на пищевых производствах и т. п. Для этой цели британская компания *Fixed-Phage* разработала метод фиксации фаговых препаратов на поверхностях, обеспечивающий сохранение биологической активности фагов до трех лет.

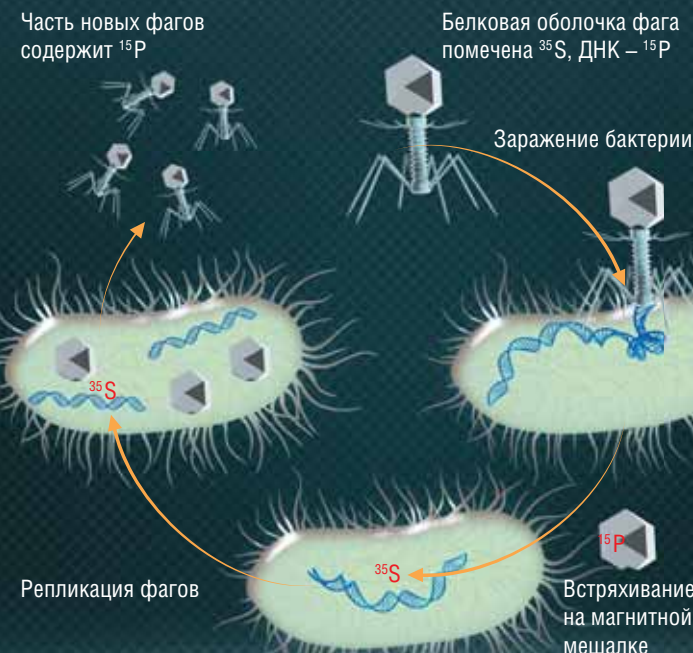
Семь дней творения

Современные методы синтетической биологии позволяют не только вносить различные модификации в фаговые геномы, но и создавать полностью искусственные активные фаги. Технологически это несложно, нужно только синтезировать фаговый геном и ввести его в бактериальную клетку, а там он уже сам запустит все процессы, необходимые для синтеза белков и сборки новых фаговых частиц. В современных лабораториях на эту работу уйдет всего несколько дней.

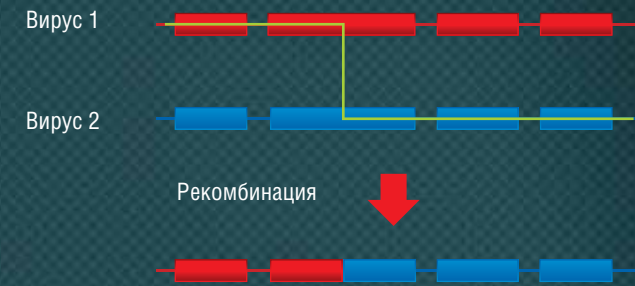
БАКТЕРИОФАГИ – «ДРОЗОФИЛЫ» МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

В 1946 г. на 11-м симпозиуме в знаменитой американской лаборатории в Колд Спринг Харборе была провозглашена теория «один ген – один фермент». Бактериолог А. Херши и «бывший» физик, молекулярный биолог М. Дельбрюк доложили об обмене генетическими признаками между различными фагами при одновременном заражении ими клеток кишечной палочки. Это открытие, сделанное в то время, когда физический носитель гена еще не был известен, свидетельствовало, что явление «рекомбинации» – перемешивания генетических признаков, свойственно не только высшим организмам, но и вирусам. Обнаружение этого феномена в дальнейшем дало возможность детально исследовать молекулярные механизмы репликации. Позднее эксперименты с бактериофагами позволили установить принципы устройства и работы генетических программ.

В 1969 г. А. Херши, М. Дельбрюк и их коллега С. Луриа стали Нобелевскими лауреатами «за открытия, касающиеся механизма репликации и генетической структуры вирусов»



Эксперимент американских исследователей А. Херши и М. Чейза с использованием бактериофагов, меченных изотопами серы и фосфора, доказали роль ДНК как основного носителя генетической информации



В качестве объектов для своих исследований М. Дельбрюк и его сотрудники использовали мутантные бактериофаги так называемой Т-серии, поражающие кишечную палочку

В 1952 г. А. Херши и М. Чейз экспериментально доказали, что наследственная информация бактериофага Т2 закодирована не в белках, как считали многие ученые, а в молекулах ДНК (Hershey & Chase, 1952). Исследователи проследили за процессом воспроизводства в двух группах бактериофагов, одна из которых несла меченные радиоактивной меткой белки, а другая – молекулы ДНК. После инфицирования бактерий такими фагами оказалось, что в зараженную клетку передается только вирусная ДНК, что и послужило доказательством ее роли в хранении и передаче наследственной информации.

В том же году американские генетики Д. Ледерберг и Н. Циндлер в эксперименте с участием двух штаммов сальмонелл и бактериофага Р22 установили, что бактериофаг способен в процессе размножения включать в себя фрагменты ДНК бактерии-хозяина и передавать их другим бактериям при заражении (Zinder & Lederberg, 1952). Это явление переноса генов от бактерии-донора к реципиенту было названо «трансдукцией». Результаты эксперимента стали очередным подтверждением роли ДНК в передаче наследственной информации.

В 1972 г. Р. Берд с коллегами при изучении процесса репликации (копирования клеточной информации) ДНК кишечной палочки использовали бактериофаги в качестве зондов, способных встраиваться в геном бактериальной клетки, и обнаружили, что процесс репликации идет в двух направлениях вдоль хромосомы (Стент, 1974).

ФЕРМЕНТЫ «ОТ БАКТЕРИОФАГА»

Большое число ферментов, сегодня широко используемых в молекулярной биологии и генетической инженерии, было открыто в результате исследований бактериофагов.

Одним из таких примеров являются ферменты рестриктазы – группа бактериальных нуклеаз, расщепляющих ДНК. Еще в начале 1950-х гг. было обнаружено, что бактериофаги, выделенные из клеток одного штамма бактерий, зачастую плохо размножаются в близкородственном штамме. Обнаружение этого феномена означало, что у бактерий есть система подавления размножения вирусов (Luria & Hatan, 1952). В результате была открыта ферментативная система рестрикции-модификации, с помощью которой бактерии разрушали попавшую в клетку чужеродную ДНК. Выделение рестриктаз (эндонуклеаз рестрикции) дало в руки молекулярных биологов бесценный инструмент, позволивший манипулировать ДНК: встраивать одни последовательности в другие или вырезать необходимые фрагменты цепи, что в итоге привело к разработке технологии создания рекомбинантной ДНК.



Первым полностью секвенированным ДНК-геномом стал геном фага φ174 длиной свыше 5 тыс. нуклеотидов (Sanger et al., 1977). Эту расшифровку осуществила группа английского биохимика Ф. Сэнгера, создателя известного одноименного метода секвенирования ДНК

Еще один широко используемый в молекулярной биологии фермент – ДНК-лигаза бактериофага T4, которая «сшивает» «липкие» и «тупые» концы двуцепочечных молекул ДНК и РНК. А недавно появились генномодифицированные варианты этого фермента с большей активностью.

От бактериофагов ведет свое происхождение и большинство используемых в лабораторной практике РНК-лигаз, которые «сшивают» одноцепочечные молекулы РНК и ДНК. В природе они в основном служат для починки сломанных молекул РНК. Исследователи наиболее часто используют РНК-лигазу бактериофага T4, с помощью которой можно «пришить» одноцепочечные полинуклеотиды к РНК-молекулам, чтобы пометить их. Такой прием применяется для анализа структуры РНК, поиска мест связывания РНК с белками, олигонуклеотидного синтеза и т. д. Недавно среди рутинно используемых ферментов появились термостабильные РНК-лигазы, выделенные из бактериофагов tm378 и TS2126 (Nordberg Karlsson et al., 2010; Hjorleifsdottir, 2014).

Из бактериофагов получены и некоторые ферменты из еще одной чрезвычайно важной группы – полимераз. Например, очень «точная» ДНК-полимераза бактериофага T7, которая нашла применение в различных областях молекулярной биологии, таких как сайт-направленный мутагенез, но в основном ее используют для определения первичной структуры ДНК.

Химически модифицированная ДНК-полимераза фага T7 была предложена как идеальный инструмент для секвенирования ДНК еще в 1987 г. (Tabor & Richardson, 1987). Модификация этой полимеразы увеличила эффективность ее работы в несколько раз: скорость полимеризации ДНК при этом достигает более 300 нуклеотидов в секунду, поэтому ее можно использовать для амплификации больших

Традиционная схема клонирования (встраивания чужеродной ДНК) с использованием в качестве «вектора» плазмиды (внехромосомного генетического элемента, присущего многим штаммам бактерий) начинается с разрезания плазмидной ДНК и вырезания «нужного» участка хромосомной ДНК с помощью фермента рестриктазы. Затем фрагмент клонируемой ДНК встраивается в плазмиду, которая вводится в бактерию, благодаря чему она становится способной производить чужеродный белок, закодированный во встроеном фрагменте

фрагментов ДНК. Этот фермент стал предшественником секвеназы – генно-инженерного фермента, оптимизированного для секвенирования ДНК в реакции Сэнгера. Секвенза отличается высокой эффективностью и способностью включать в последовательность ДНК нуклеотидные аналоги, используемые для улучшения результатов секвенирования.

Происхождение от бактериофагов ведут и используемые в молекулярной биологии основные РНК-полимеразы (ДНК-зависимые РНК-полимеразы) – ферменты, которые катализируют процесс транскрипции (считывание РНК-копий с матрицы ДНК). К ним относятся SP6-, T7- и T3-РНК-полимеразы, названные в честь соответствующих бактериофагов SP6, T7 и T3. Все эти ферменты используются для синтеза «в пробирке» антисмысловых РНК-транскриптов, меченых РНК-зондов и т. д.

Полинуклеотидкиназы катализируют перенос фосфатной группы от молекулы АТФ к 5'-концу молекулы нуклеиновой кислоты, обмен 5'-фосфатных групп или фосфорилирование 3'-концов мононуклеотидов. В лабораторной практике наибольшее распространение получила полинуклеотидкиназа бактериофага T4. Она обычно используется в экспериментах для мечения ДНК радиоактивным изотопом фосфора. Полинуклеотидкиназа также применяется для поиска сайтов рестрикции, ДНК и РНК дактилоскопии, синтеза субстратов для ДНК или РНК-лигаз.

В рутинных молекулярно-биологических экспериментах также используются такие ферменты бактериофагов, как эндонуклеазы (ферменты, расщепляющие ДНК), например, эндонуклеаза фага T4 (резолваза) и фага T7. Эти ферменты используются для получения одноцепочечных ДНК-матриц для секвенирования или анализа нуклеотидного полиморфизма.

Генетические модификации применяют, чтобы изменить специфичность фагов и повысить эффективность их терапевтического действия. Для этого наиболее агрессивные фаги снабжают узнающими структурами, связывающими их с целевыми бактериями. Также в вирусные геномы дополнительно встраивают гены, кодирующие токсические для бактерий белки, нарушающие метаболизм, – такие фаги более смертоносны для бактерий.

Бактерии имеют несколько механизмов защиты от антибиотиков и бактериофагов, один из которых – разрушение вирусных геномов ферментами рестрикции, действующими на определенные нуклеотидные последовательности. Для увеличения терапевтической активности фагов можно за счет вырожденности генетического кода так «перформатировать» последовательности их генов, чтобы минимизировать число нуклеотидных последовательностей, «чувствительных» к ферментам, одновременно сохранив их кодирующие свойства.

Универсальный способ защиты бактерий от всех внешних воздействий – так называемые биофильмы (пленки) из ДНК, полисахаридов и белков, которые бактерии создают совместными усилиями и куда не проникают ни антибиотики, ни терапевтические белки. Такие биофильмы – головная боль врачей, так как они способствуют разрушению зубной эмали, образуются на поверхности имплантов, катетеров, искусственных суставов, а также в дыхательных путях, на поверхности кожи и т. п. Для борьбы с биофильмами были сконструированы особые бактериофаги, содержащие ген, кодирующий специальный литический фермент, разрушающий бактериальные полимеры.

Методами синтетической биологии удалось разработать и бактериофаги, вооруженные самым изощренным оружием, которое бактерии используют против самих фагов. Речь идет о бактериальных системах CRISPR-Cas, представляющих собой комплекс фермента нуклеазы, расщепляющей ДНК, и специального «указателя», направляющего действие фермента на определенный фрагмент вирусного генома. Суть в том, что после встречи с вирусом бактерия сохраняет «на память» кусочек его ДНК в специальном гене. На основе этого ДНК-фрагмента бактерия синтезирует соответствующую РНК, которая и становится частью белково-нуклеотидного комплекса. Комплекс с нуклеазой распознает и атакует ДНК фага, проникающую в клетку, и разрушает ее.

Разобравшись с механизмом работы систем CRISPR-Cas, исследователи попробовали снабдить подобным «оружием» и самих фагов, для чего в их геном ввели комплекс генов, кодирующий нуклеазу и адресующие последовательности РНК, комплементарные специфическим участкам генома бактерий. «Мишенью» могут выступать гены, ответственные за множественную лекарственную устойчивость. Эксперименты увенчались полным успехом – такие фаги с большой эффективностью поражали бактерии, на которые были «настроены».

Фаговые антибиотики

В терапевтических целях фаги необязательно использовать напрямую. За миллионы лет эволюции бактериофаги разработали арсенал специфических белков – инструментов для распознавания целевых микроорганизмов и манипуляций с биополимерами жертвы, на основе которых можно создавать противобактериальные препараты. Наиболее перспективными белками такого типа являются ферменты *эндолизин*ы, которые фаги используют для разрушения клеточной стенки

при выходе из бактерии. Сами по себе эти вещества являются мощными антибактериальными средствами, нетоксичными для человека. Эффективность и направленность их действия можно повысить, изменив в них адресующие структуры – белки, специфически связывающиеся с определенными бактериями.

Большинство бактерий делятся по устройству клеточной стенки на *грамположительные*, мембрана которых покрыта очень толстым слоем пептидогликанов, и *грамотрицательные*, у которых слой пептидогликана расположен между двумя мембранами. Использование природных эндолизинов особенно эффективно в случае грамположительных бактерий (стафилококков, стрептококков и др.), поскольку пептидогликановый слой у них расположен снаружи. Грамотрицательные бактерии (синегнойная палочка, сальмонеллы, кишечная палочка и др.) являются менее доступной мишенью, поскольку ферменту, чтобы добраться до внутреннего пептидогликанового слоя, необходимо проникнуть сквозь внешнюю бактериальную мембрану.

Для преодоления этой проблемы были созданы так называемые *артилизины* – модифицированные варианты природных эндолизинов, содержащие поликатионные или амфипатические пептиды, которые дестабилизируют внешнюю мембрану и обеспечивают доставку эндолизина непосредственно к пептидогликановому слою. Артилизины обладают высокой бактерицидной активностью и уже показали свою эффективность при лечении отитов у собак (Briers *et al.*, 2014).

Примером модифицированного эндолизина, избирательно действующего на определенные бактерии, является препарат P128 канадской компании *GangaGen*. Он представляет собой биологически активный фрагмент эндолизина, соединенный с *лизостафином* – адресующей белковой молекулой, которая связывается с поверхностью клеток стафилококков. Полученный химерный белок обладает высокой активностью против разных штаммов стафилококка, в том числе со множественной лекарственной устойчивостью.

«Счетчики» бактерий

Бактериофаги служат не только разносторонним терапевтическим и «дезинфицирующим» средством, но и удобным и точным аналитическим инструментом микробиолога. К примеру, благодаря своей высокой специфичности они являются природными аналитическими реагентами для выявления бактерий определенного вида и штамма.

В простейшем варианте такого исследования в чашку Петри с питательной средой, засеянную бактериальной культурой, добавляют по капле различные диагностические бактериофаги. Если бактерия окажется чувствительной к фагу, то на этом месте бактериального

«газона» образуется «бляшка» – прозрачный участок с убитыми и лизированными бактериальными клетками.

Анализируя размножение фагов в присутствии целевых бактерий, можно количественно определить численность последних. Так как количество фаговых частиц в растворе возрастет пропорционально числу содержащихся в нем бактериальных клеток, то для оценки численности бактерий достаточно определить титр бактериофага.

Специфичность и чувствительность такой аналитической реакции достаточно высока, а сами процедуры просты в исполнении и не требуют сложного оборудования. Важно, что диагностические системы, основанные на бактериофагах, сигнализируют о наличии именно живого патогена, тогда как другие методы, такие как ПЦР и иммуно-аналитические, свидетельствуют лишь о наличии биополимеров, принадлежащих этой бактерии. Такого типа диагностические методы особенно удобны для использования в экологических исследованиях, а также в пищевой индустрии и сельском хозяйстве.

Сейчас для выявления и количественного определения разных штаммов микроорганизмов применяют специальные *референсные виды* фагов. Очень быстрые, работающие практически в режиме реального времени аналитические системы могут быть созданы на основе генетически модифицированных бактериофагов, которые при попадании в бактериальную клетку запускают в ней синтез репортерных флуоресцирующих (или способных к люминесценции) белков, таких как *люцифераза*. При добавлении к подобной среде необходимых субстратов в ней будет появляться люминесцентный сигнал, величина которого соответствует содержанию бактерий в образце. Такие «меченные светом» фаги были разработаны для детекции опасных патогенов – возбудителей чумы, сибирской язвы, туберкулеза, а также инфекций растений.

Вероятно, с помощью модифицированных фагов удастся решить и давнюю задачу глобальной важности – разработать дешевые и быстрые методы детекции возбудителей туберкулеза на ранней стадии заболевания. Задача эта очень сложна, поскольку микобактерии, вызывающие туберкулез, отличаются крайне медленным ростом при культивировании в лабораторных условиях. Поэтому диагностика заболевания традиционными методами может затягиваться на срок до нескольких недель.

Фаговая технология позволяет упростить эту задачу. Суть ее в том, что к образцам анализируемой крови добавляют бактериофаг D29, способный поражать широкий спектр микобактерий. Затем бактериофаги отделяют, и образец перемешивают с быстрорастущей непатогенной культурой микобактерий, также

чувствительной к этому бактериофагу. Если в крови первоначально имелись микобактерии, которые были инфицированы фагами, то в новой культуре будет также наблюдаться наработка бактериофага. Таким образом можно выявить единичные клетки микобактерий, а сам процесс диагностики с 2–3 недель сокращается до 2–5 дней (Swift & Rees, 2016).

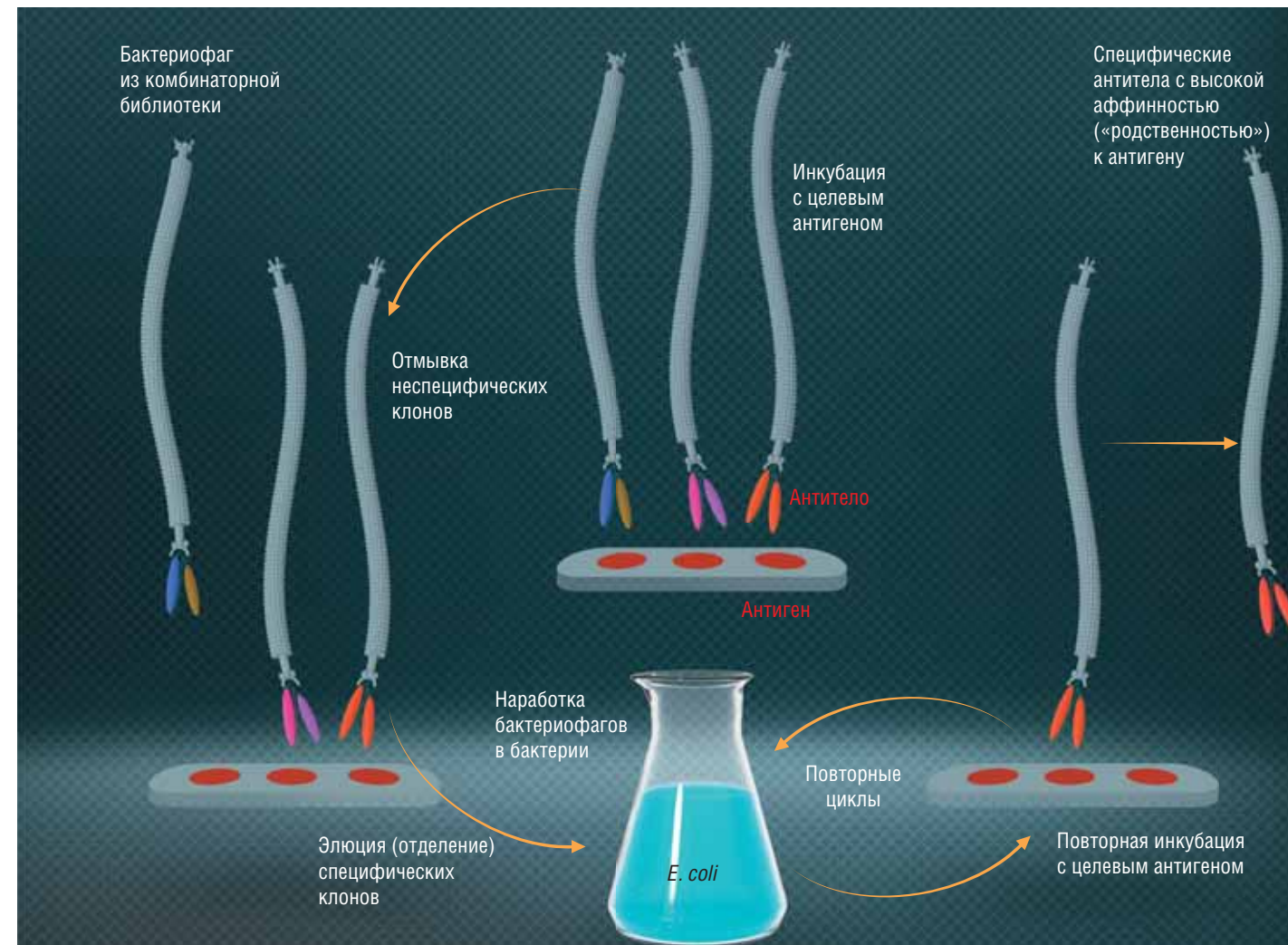
Фаговый дисплей

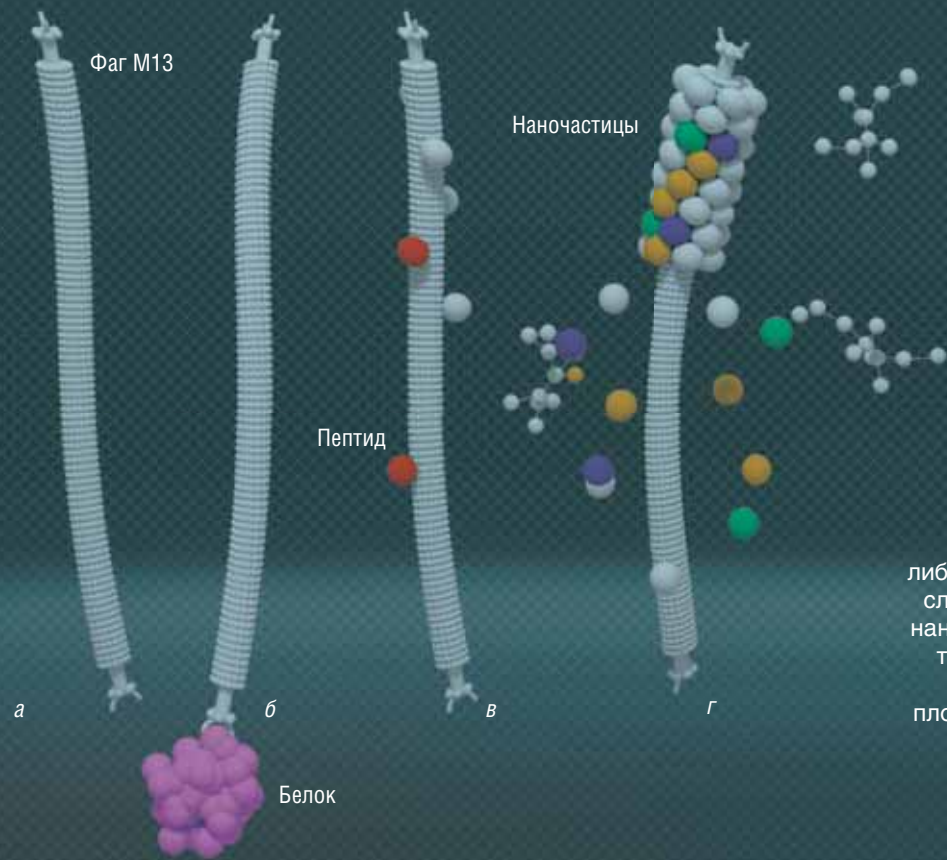
В наши дни бактериофаги широко применяются также в качестве простых систем для наработки белков с заданными свойствами. Речь идет о разработанной в 1980-х гг. крайне эффективной молекулярно-селекционной методике – *фаговом дисплее*. Этот термин был предложен американцем Дж. Смитом, который доказал, что на основе бактериофагов кишечной палочки можно создать жизнеспособный модифицированный вирус, несущий на своей поверхности чужеродный белок. Для этого в фаговый геном внедряется соответствующий

ген, который сливается с геном, кодирующим один из поверхностных вирусных белков. Такие модифицированные бактериофаги можно выделить из смеси с фагами дикого типа благодаря способности «чужого» белка связываться со специфичными антителами (Smith, 1985).

Из экспериментов Смита последовало два важных вывода: во-первых, используя технологию рекомбинантных ДНК, можно создавать огромные по разнообразию популяции численностью 10^6 – 10^{14} фаговых частиц, каждая из которых несет на своей поверхности разные варианты белков. Такие популяции назвали *комбинаторные фаговые библиотеки*. Во-вторых, выделив из популяции конкретный фаг (например, обладающий

Принципиальная схема процедуры биопеннинга – отбора высокоспецифичных рекомбинантных антител к конкретной мишени-антигену из комбинаторной библиотеки фагового дисплея на основе нитчатых бактериофагов. По: (Тикунова, Морозова, 2009)





Нитчатый бактериофаг M13, размножающийся в обычной кишечной палочке (а), может нести на своей поверхности рекомбинантные чужеродные белки, такие как антитела (б) либо пептиды (в). Он также может служить шаблоном для создания наноустройств и наноматериалов, таких как нанокристаллический катализатор с известной площадью поверхности и нужным распределением пор (г)

способностью связываться с определенным белком или органической молекулой), можно этот фаг размножить в бактериальных клетках и получить неограниченное число потомков с заданными свойствами.

С помощью фагового дисплея сегодня производят белки, которые могут избирательно связываться с терапевтическими мишенями, например, экспонированные на поверхности фага M13, способные узнавать и взаимодействовать с опухолевыми клетками. Роль этих белков в фаговой частице заключается в «упаковке» нуклеиновой кислоты, поэтому они хорошо подходят и для создания препаратов генотерапии, только в этом случае они формируют частицу уже с терапевтической нуклеиновой кислотой.

На сегодня можно выделить два основных направления применения фагового дисплея. Технология на основе пептидов используется для исследования рецепторов и картирования сайтов связывания антител, создания иммуногенов и нановакцин, а также картирования сайтов связывания субстратов у белков-ферментов. Технология на основе белков и белковых доменов – для отбора антител с заданными свойствами, изучения белок-лигандных взаимодействий, скрининга экспрессируемых фрагментов комплементарной ДНК и направленных модификаций белков.

С помощью фагового дисплея можно вносить узнающие группировки во все виды поверхностных вирусных белков, а также в основную белок, формирующую тело бактериофага. Вводя в поверхностные белки пептиды с заданными свойствами, можно получить целый спектр ценных биотехнологических продуктов. Например, если этот пептид будет имитировать белок опасного вируса или бактерии, узнаваемый иммунной системой, то такой модифицированный бактериофаг представляет собой вакцину, которую можно просто, быстро и безопасно наработать.

Если же концевой поверхностный белок бактериофага «адресовать» на раковые клетки, а к другому поверхностному белку присоединить репортерные группы (например, флуоресцирующие или магнитные), то получится средство для обнаружения опухолей. А если к частице присоединить еще и цитотоксический препарат (а современная биоорганическая химия позволяет легко это сделать), то получится лекарство, направленно действующее на раковые клетки.

Одним из важных применений метода фагового дисплея белков является создание фаговых библиотек рекомбинантных антител, где антигенсвязывающие фрагменты иммуноглобулинов расположены на поверхности фаговых частиц fd или M13. Особый интерес

Разработаны методы, позволяющие располагать нитчатые бактериофаги один за другим («хвост к хвосту»). Получающиеся в результате мультифаговые структуры представляют собой упорядоченные наноматрицы, которые могут быть использованы для создания транзисторных и диодных устройств

представляют библиотеки антител человека, поскольку такие антитела могут быть использованы в терапии без ограничения. В последние годы только на фармацевтическом рынке США продается около полутора десятка терапевтических антител, сконструированных с использованием этого метода.

«Промышленные» фаги

Методология фагового дисплея нашла себе и совершенно неожиданное применение. Ведь бактериофаги в первую очередь являются наноразмерными частицами определенной структуры, на поверхности которых располагаются белки, которые с помощью фагового дисплея можно «снабдить» свойствами специфически связываться с нужными молекулами. Такие наночастицы открывают широчайшие возможности для создания материалов с заданной архитектурой и «умных» молекулярных наноустройств, при этом технологии их производства являются экологически чистыми.

Так как вирус представляет собой достаточно жесткую конструкцию с определенным соотношением размерностей, это обстоятельство позволяет использовать его для получения пористых наноструктур с известной площадью поверхности и нужным распределением пор в структуре. Как известно, именно площадь поверхности катализатора является критическим параметром, определяющим его эффективность. А существующие на сегодня технологии формирования на поверхности бактериофагов тончайшего слоя металлов и их оксидов позволяют получать катализаторы с чрезвычайно развитой регулярной поверхностью заданной размерности. (Lee *et al.*, 2012).

Исследователь из Массачусетского технологического института А. Бельхер использовала бактериофаг M13 как шаблон для роста наночастиц и нанопроводов родия и никеля на поверхности оксида церия. Полученные наночастицы катализатора способствуют «конвертации» этанола в водород, таким образом, этот катализатор может оказаться весьма полезным для модернизации существующих и создания новых водородных топливных ячеек. Катализатор, выращенный на шаблоне вируса, отличается от аналогичного по составу «обычного» катализатора более высокой стабильностью, он менее подвержен старению и дезактивации поверхности (Nam *et al.*, 2012).

Путем покрытия нитчатых фагов золотом и двуокисью индия были получены электрохромные материалы – пористые нанопленки, меняющие цвет при изменении электрического поля, способные реагировать на изменение электрического поля в полтора раза быстрее известных аналогов. Подобного рода материалы перспективны для создания энергосберегающих ультратонких экранных устройств (Nam *et al.*, 2012).

В Массачусетском технологическом институте бактериофаги стали основой для производства очень мощных и чрезвычайно компактных электрических батарей. Для этого использовали живые, генетически модифицированные фаги M13, неопасные для человека и способные присоединять к поверхности ионы различных металлов. В результате самосборки этих вирусов были получены структуры заданной конфигурации, которые при покрытии металлом сформировали достаточно длинные нанопровода, ставшие основой анода и катода. При самоформировании материала анода использовался вирус, способный присоединять золото и оксид кобальта, для катода – способный присоединять фосфат железа и серебро. Последний фаг также обладал способностью за счет молекулярного опознавания «подхватывать» концы углеродной нанотрубки, что необходимо для обеспечения эффективного переноса электронов.

На основе комплексов бактериофага M13, двуокиси титана и одностенных углеродных нанотрубок были также созданы материалы для солнечных батарей (Dang *et al.*, 2011).

Последние годы ознаменовались широкими исследованиями бактериофагов, которые находят себе все новые применения не только в терапии, но и в био- и нанотехнологиях. Их очевидным практическим результатом должно стать возникновение нового мощного направления персонализированной медицины, а также создание целого спектра технологий в пищевой промышленности, ветеринарии, сельском хозяйстве и в производстве современных материалов. Мы ждем, что второе столетие исследований бактериофагов принесет не меньше открытий, чем первое.

Литература

- Бактериофаги: биология и применение / Ред.: Э. Камтер, А. Сулаквелидзе. М.: Научный мир. 2012.
 Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика. М.: Мир. 1974. 614 с.
 Тикунова Н. В., Морозова В. В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae*. 2009. № 3. С. 6–15.
 Mc Grath S., van Sinderen D. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press, 2007.

А. А. ШИРЯЕВА, А. В. СТРОЦКАЯ, К. В. СЕВЕРИНОВ

Вирусы и бактерии — великое противостояние

Создание современной технологии геномного редактирования, которая уже с успехом применяется на разных животных, растениях, грибах и бактериях, базируется на исследованиях бактериальных систем CRISPR-Cas. Изначально предполагалось, что они участвуют в ликвидации повреждений бактериальной ДНК, но в 2007 г. стало ясно, что истинное предназначение этих систем – борьба с вирусами бактерий, бактериофагами. Всего за девять лет наука проделала гигантский путь от раскрытия механизма бактериального иммунитета до редактирования геномов людей – в настоящее время уже проводятся первые эксперименты по редактированию ДНК человеческих эмбрионов. У бактерий имеются и другие «иммунные» механизмы, изучение которых, возможно, создаст предпосылки для новых прорывов в биомедицине

Ключевые слова: бактериофаги, механизмы бактериального иммунитета, системы CRISPR-Cas, редактирование геномов.

Key words: bacteriophages, bacterial defense mechanisms, CRISPR-Cas systems, genome editing



ШИРЯЕВА Анна Александровна – аспирант Сколковского института науки и технологий (Москва), стажер-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. Соавтор 1 научной публикации



СТРОЦКАЯ Александра Валерьевна – аспирант и младший научный сотрудник лаборатории системной биомедицины и биотехнологии Сколковского института науки и технологий (Москва). Автор и соавтор 3 научных публикаций



СЕВЕРИНОВ Константин Викторович – доктор биологических наук, профессор Сколковского института науки и технологий (Москва), Ратгерского университета (Нью-Джерси, США), Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого; заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов мобильных элементов прокариот Института молекулярной генетики РАН (Москва), лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института биологии гена РАН (Москва). Автор и соавтор более 200 научных публикаций

Бактериофаги – это вирусы, которые поражают только бактерий. В ходе инфекции они влияют на все процессы жизнедеятельности бактериальной клетки, фактически превращая ее в фабрику по производству вирусного потомства. В конце концов клетка разрушается, а вновь образованные вирусные частицы выходят наружу и могут заражать новые бактерии.

Несмотря на огромное число и разнообразие природных фагов, встречаемся мы с ними редко. Однако бывают ситуации, когда деятельность этих вирусов не остается незамеченной. Например, на предприятиях, где производят сыры, йогурты и другие молочно-кислые продукты, часто приходится сталкиваться с вирусной атакой на бактерии, сбрасывающие молоко. В большинстве таких случаев фаговая инфекция распространяется молниеносно, и полезные бактерии гибнут, что приводит к значительным экономическим потерям (Neve *et al.*, 1994).

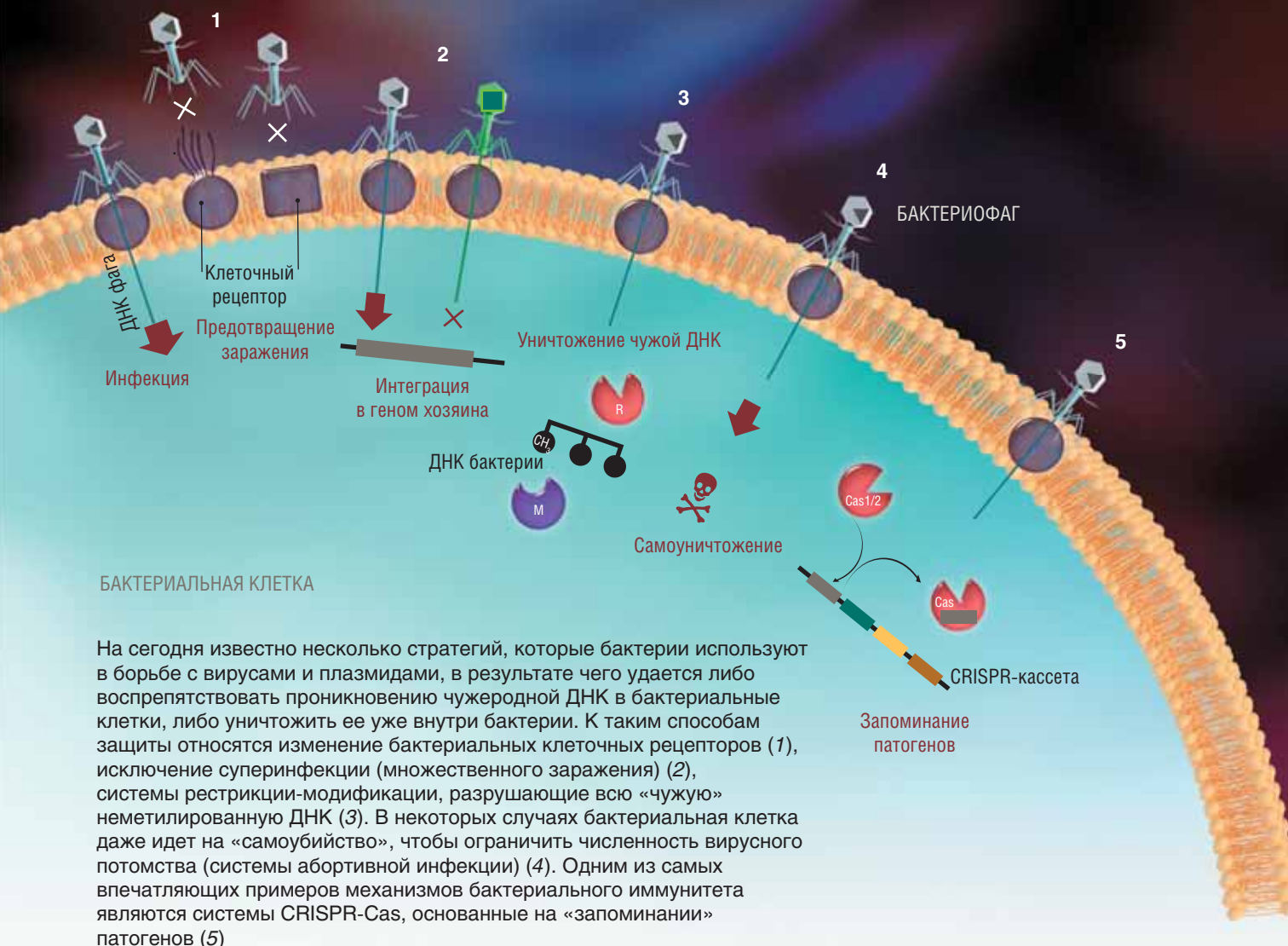
Именно благодаря прикладным исследованиям в интересах молочной промышленности, направленным на получение устойчивых к бактериофагам штаммов молочно-кислых бактерий, был открыт ряд механизмов, с помощью которых бактерии избегают инфекции. Параллельно были изучены способы, с помощью которых вирусы, в свою очередь, преодолевают бактериальные системы защиты (Moineau *et al.*, 1993).

Кто защищен – тот вооружен

На сегодня известно пять основных, весьма хитроумных механизмов защиты, которые бактерии выработали в непрестанной борьбе с вирусами: изменение рецептора на поверхности клетки; исключение суперинфекции; системы abortивной инфекции; системы рестрикции-модификации и, наконец, системы CRISPR-Cas.

В ходе эволюции происходила и сейчас происходит селекция бактерий, способных избежать гибели при инфицировании вирусами, что, в свою очередь, служит стимулом для бактериофагов совершенствовать свои агрессивные стратегии. Эта «гонка вооружений», длящаяся несколько миллиардов лет, т. е. ровно столько, сколько существуют сами бактерии и их враги, породила целый ряд изощренных механизмов защиты и нападения

© А. А. Ширяева, А. В. Строчкая, К. В. Северинов



БАКТЕРИАЛЬНАЯ КЛЕТКА

На сегодня известно несколько стратегий, которые бактерии используют в борьбе с вирусами и плазмидами, в результате чего удается либо воспрепятствовать проникновению чужеродной ДНК в бактериальные клетки, либо уничтожить ее уже внутри бактерии. К таким способам защиты относятся изменение бактериальных клеточных рецепторов (1), исключение суперинфекции (множественного заражения) (2), системы рестрикции-модификации, разрушающие всю «чужую» неметилированную ДНК (3). В некоторых случаях бактериальная клетка даже идет на «самоубийство», чтобы ограничить численность вирусного потомства (системы abortивной инфекции) (4). Одним из самых впечатляющих примеров механизмов бактериального иммунитета являются системы CRISPR-Cas, основанные на «запоминании» патогенов (5)

Вирусная атака начинается с прикрепления фага к специфическому рецептору на поверхности бактериальной клетки, но при *потере рецептора или изменении в его структуре* связывания вируса не происходит. Бактерии могут менять рецепторы в зависимости от окружающих условий, таких как плотность и разнообразие микроорганизмов в среде, а также доступность питательных веществ (Bikard *et al.*, 2012). Любопытный пример – бактерии вида *Vibrio anguillarum*, которые способны формировать *биопленку*, т.е. плотный слой клеток, прикрепленный к какой-либо поверхности. У этой бактерии имеется своего рода «чувство кворума», за счет чего при увеличении плотности клеток у них понижается выработка рецептора, с которым может связываться вирус. В результате биопленка становится почти полностью устойчивой к заражению (Tan *et al.*, 2015).

Однако потеря рецепторов не всегда выгодна для бактерии, поскольку они выполняют разнообразные важные функции, например, транспорт питательных веществ или формирование межклеточных контактов (Lopez-Pascua *et al.*, 2008). В результате для каждой пары «бактерия-бактериофаг» в ходе эволюции находится оптимальное решение, обеспечивающее приемлемый уровень защиты при сохранении возможности роста бактерий в различных условиях среды.

Следующий защитный механизм – *исключение суперинфекции*. Для бактериофагов известны два основных пути инфекции: *литический*, приводящий к быстрой гибели зараженной бактерии с высвобождением вирусного потомства, и *затяжной лизогенный* путь, когда наследственный материал вируса находится внутри генома бактерии, удваивается только с хозяйской ДНК, не причиняя клетке вреда. Когда клетка находится

В 1978 г. за открытие ферментов рестриктаз швейцарский генетик В. Арбер и американские микробиологи Д. Натанс и Г. Смит были удостоены Нобелевской премии. Изучение систем рестрикции-модификации привело к созданию технологии молекулярного клонирования, которая широко применяется во всем мире. С помощью рестриктаз можно «вырезать» гены из генома одного организма и вставить в геном другого, получив химерную рекомбинантную ДНК, не существующую в природе. Различные вариации этого подхода используются учеными для изолирования отдельных генов и их дальнейшего изучения. Кроме того, он широко применяется в фармацевтике, например, для наработки инсулина или терапевтических антител: все лекарства такого рода созданы с помощью молекулярного клонирования, т.е. являются продуктом генной модификации

в состоянии лизогенной инфекции, то, с точки зрения «домашнего» вируса (*профага*), ее заражение другим вирусом нежелательно.

Действительно, многие вирусы, встроившие свою ДНК в геном клетки, ограничивают вновь проникшего в клетку бактериофага («суперинфекцию») посредством специальных белков-репрессоров, не позволяющих генам «пришельца» работать (Calendar, 2006). А некоторые фаги даже препятствуют другим вирусным частицам проникнуть в инфицированную ими клетку, воздействуя на ее рецепторы. В результате бактерионосительницы вируса имеют очевидное преимущество по сравнению с незараженными собратьями.

Во время инфекции все ресурсы бактериальной клетки направлены на производство новых вирусных частиц. Если рядом с такой клеткой будут находиться другие уязвимые бактерии, то инфекция быстро распространится и приведет к гибели большинства из них. Однако для таких случаев у бактерии имеются так называемые системы *abortивной инфекции*, которые приводят ее к запрограммированной гибели. Конечно, этот «альтруистичный» механизм не спасет саму зараженную клетку, но остановит распространение вирусной инфекции, что выгодно для всей популяции. Бактериальные системы abortивной инфекции очень разнообразны, но детали их функционирования пока изучены недостаточно.

К средствам противовирусной защиты бактерий относятся и системы *рестрикции-модификации*, в которые входят гены, кодирующие два белка-фермента – *рестриктазу* и *метилазу*. Рестриктаза узнает определенные последовательности ДНК длиной 4–6 нуклеотидов и вносит в них двуцепочечные разрывы. Метилаза, напротив, ковалентно модифицирует эти последовательности, добавляя к отдельным нуклеотидным

основаниям метильные группы, что предотвращает их узнавание рестриктазой.

В ДНК бактерии, содержащей такую систему, все сайты модифицированы. И если бактерия заражается вирусом, ДНК которого не содержит подобной модификации, рестриктаза защитит ее от инфекции, разрушив вирусную ДНК. Многие вирусы «борются» с системами рестрикции-модификации, не используя в своих геномах последовательности, узнаваемые рестриктазой, – очевидно, что вирусные варианты с другой стратегией просто не оставили потомства.

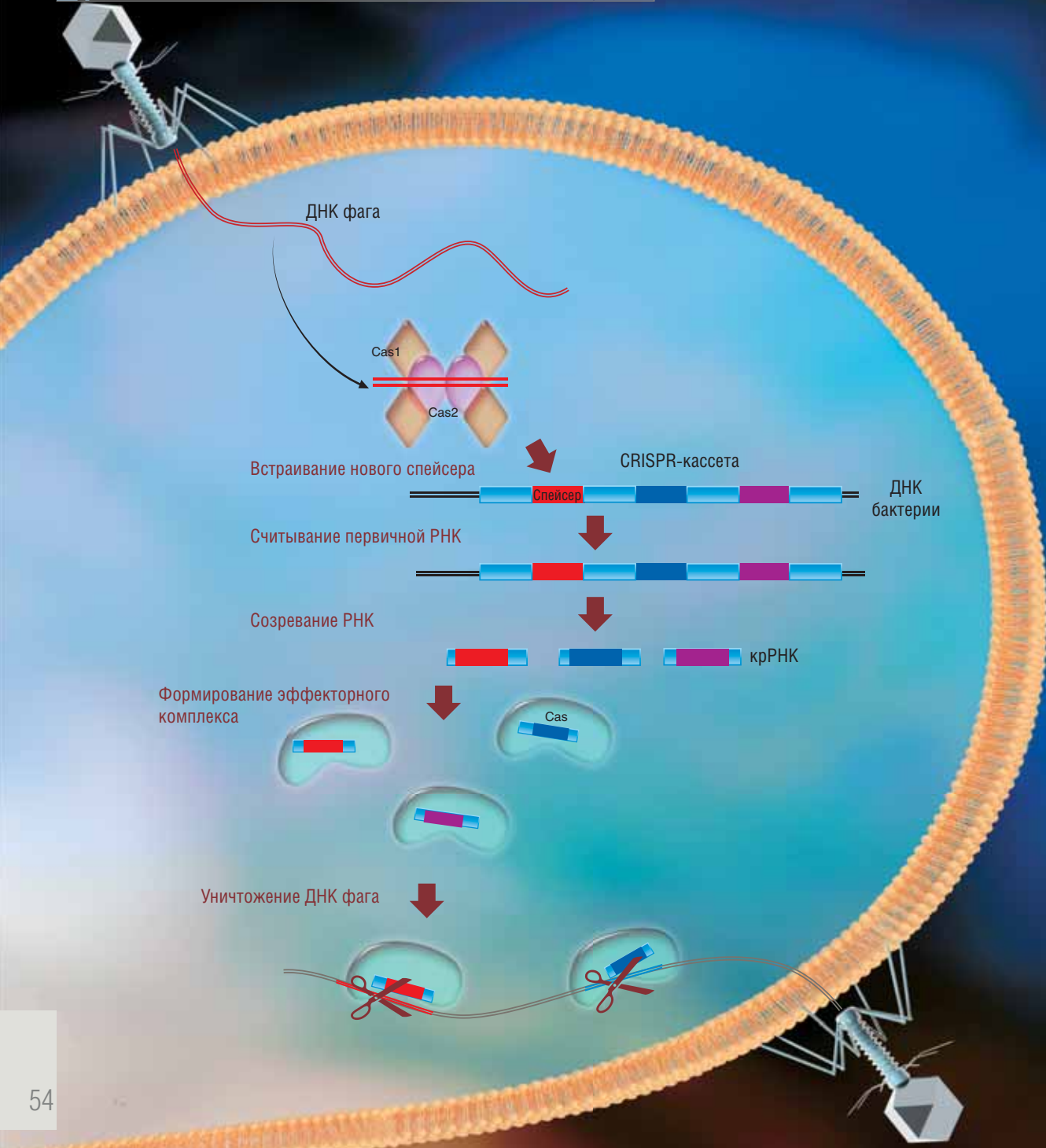
Последней и в настоящее время самой интересной системой бактериального иммунитета является система *CRISPR-Cas*, с помощью которой бактерии способны «записывать» в собственный геном и передавать потомству информацию о фагах, с которыми они сталкивались в течение жизни. Наличие таких «воспоминаний» позволяет распознавать ДНК фага и эффективней противостоять ему при повторных инфекциях. В настоящее время к системам CRISPR-Cas приковано пристальное внимание, так как они стали основой революционной технологии редактирования геномов, которая в будущем, возможно, позволит лечить генетические заболевания и создавать новые породы и сорта сельскохозяйственных животных и растений.

Врага нужно знать в лицо

Системы CRISPR-Cas являются уникальным примером адаптивного иммунитета бактерий. При проникновении в клетку ДНК фага специальные белки Cas встраивают фрагменты вирусной ДНК длиной 25–40 нуклеотидов в определенный участок генома бактерии (Barrangou *et al.*, 2007). Такие фрагменты называются *спейсерами* (от англ. *spacer* – промежуток), участок, где происходит встраивание, – *CRISPR-кассета* (от англ. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), а сам процесс приобретения спейсеров – *адаптация*.

Чтобы использовать спейсеры в борьбе с фаговой инфекцией, в клетке должен происходить еще один процесс, управляемый белками Cas, названный *интерференцией*. Суть его в том, что в ходе транскрипции CRISPR-кассеты образуется длинная молекула РНК, которая разрезается белками Cas на короткие фрагменты – защитные *криспРНК* (крРНК), каждая из которых содержит один спейсер. Белки Cas вместе с молекулой крРНК образуют *эффекторный комплекс*, который сканирует всю ДНК клетки на наличие последовательностей, идентичных спейсеру (*протоспейсеров*). Найденные протоспейсеры расщепляются белками Cas (Westra *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012).

Системы CRISPR-Cas обнаружены у большинства прокариот – бактерий и архей. Хотя общий принцип



При формировании адаптивного иммунитета бактерий бактериальные белки Cas1 и Cas2 встраивают фрагменты вирусной ДНК в качестве спейсеров в CRISPR-кассету, в которой соседние спейсеры отделены друг от друга повторами ДНК (Nuñez *et al.*, 2014, 2015a, b). CRISPR-кассета транскрибируется с образованием длинной некодирующей РНК. Специальные белки Cas, а также, в некоторых случаях, другие белки бактерии нарезают эту РНК на короткие криспРНК (крРНК), каждая из которых содержит один спейсер и часть повтора. В ходе интерференции белки Cas вместе с крРНК образуют эффекторный комплекс, который сканирует ДНК клетки в поисках последовательностей, соответствующих спейсеру крРНК, и разрезает их (Westra *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012)

Бактериофаги, как факторы среды, вызывают направленные изменения в геноме бактерий, которые наследуются и дают бактериям явное преимущество, спасая от повторных инфекций. Поэтому системы CRISPR-Cas можно считать примером ламарковской эволюции, при которой происходит наследование благоприобретенных признаков (Koonin *et al.*, 2009)

действия всех известных систем CRISPR-Cas одинаков, механизмы их работы могут существенно отличаться в деталях. Наибольшие различия проявляются в строении и функционировании эффекторного комплекса, в связи с чем системы CRISPR-Cas делят на несколько типов. На сегодняшний день описаны шесть типов таких неродственных друг другу систем (Makarova *et al.*, 2015; Shmakov *et al.*, 2015).

Наиболее изученной является система CRISPR-Cas I типа, которой обладает излюбленный объект молекулярно-биологических исследований – бактерия кишечная палочка (*Escherichia coli*). Эффекторный комплекс в этой системе состоит из нескольких небольших белков Cas, каждый из которых отвечает за разные функции: разрезание длинной некодирующей CRISPR РНК, связывание коротких крРНК, поиск, а затем разрезание ДНК-мишени.

В системах II типа эффекторный комплекс образован единственным большим белком Cas9, который в одиночку справляется со всеми задачами. Именно простота и относительная компактность таких систем послужили основой для разработки технологии редактирования ДНК. Согласно этому методу, в клетки эукариот (например, человека) доставляют бактериальный белок Cas9 и крРНК, которую называют *гидовой* (гРНК). Вместо спейсера вирусного происхождения такая гРНК содержит целевую последовательность, соответствующую интересному для исследователя участку генома, например, где есть мутация, вызывающая какую-то болезнь. Получить же гРНК «на любой вкус» совсем несложно.

Эффекторный комплекс Cas9-гРНК вносит двуцепочечный разрыв в последовательность ДНК, точно соответствующую «гидовой» РНК. Если вместе с Cas9 и гРНК внести в клетку и последовательность ДНК, не содержащую мутацию, то место разрыва будет восстановлено по матрице «правильной» копии! Таким образом, используя разные гРНК, можно исправлять нежелательные мутации или вводить направленные изменения в гены-мишени. Высокая точность программируемого узнавания мишеней комплексом Cas9-гРНК и простота метода привели к лавинообразному росту работ по редактированию геномов клеток животных и растений (Jiang & Marraffini, 2015).

Гонка вооружений

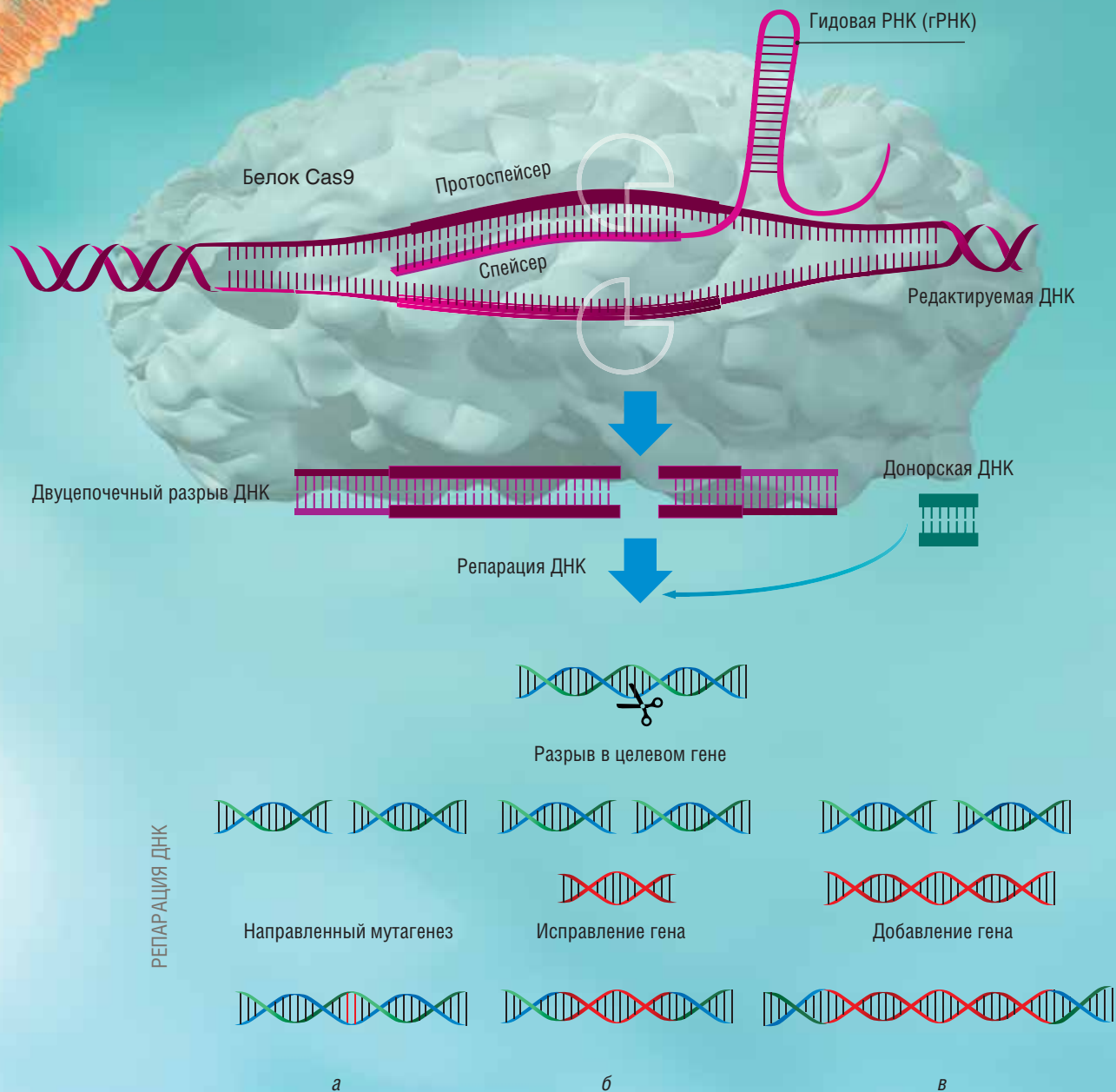
В ходе эволюции бактерии и бактериофаги выработали ряд приспособлений, которые должны обеспечить каждому из участников «гонки вооружений» преимущество в борьбе с противником или возможность уклониться от его атаки.

Что касается систем CRISPR-Cas, то если фаг обзаведется мутацией в протоспейсере, эффективность его узнавания эффекторным комплексом снижается, и фаг получает возможность заразить клетку. Но и бактерия не оставит без внимания такую попытку ускользнуть от CRISPR-Cas: в качестве ответной реакции она начинает с резко возросшей эффективностью приобретать новые дополнительные спейсеры из ДНК уже «знакомого» фага, пусть и мутировавшего. Такое явление, названное праймированной адаптацией, многократно повышает эффективность защитного действия систем CRISPR-Cas (Datsenko *et al.*, 2012).

Некоторые бактериофаги реагируют на наличие в бактериальной клетке систем CRISPR-Cas выработкой особых анти-CRISPR белков, способных связываться с белками Cas и блокировать их функции (Bondy-Denomy *et al.*, 2015). Еще одно ухищрение – обмен участками генома вируса, на которые нацелена система CRISPR-Cas, на участки геномов родственных вирусов, отличающихся по составу нуклеотидной последовательности (Paez-Espino *et al.*, 2015).

Результаты работ нашей лаборатории свидетельствуют, что зараженные клетки на самом деле погибают даже при наличии защиты CRISPR-Cas, но при этом они ограничивают численность вирусного потомства. Поэтому CRISPR-Cas правильнее относить к системам abortивной инфекции, а не к «настоящим» иммунным системам.

Благодаря постоянному совершенствованию биоинформатических алгоритмов поиска, а также включению в анализ все большего количества прокариотических геномов, открытие новых типов CRISPR-Cas систем является делом недалекого будущего. Предстоит также выяснить и детальные механизмы работы многих недавно открытых систем. Так, в статье, опубликованной в 2016 г. в журнале *Science* и посвященной анализу системы CRISPR-Cas VI типа, описан белок C2c2, образующий эффекторный комплекс с крРНК, который нацелен на деградацию не ДНК, а РНК (Abudayyeh *et al.*, 2016). В будущем такое необычное свойство может быть использовано в медицине для регулирования активности генов путем изменения количества кодируемых ими РНК.



Система CRISPR-Cas, используемая для редактирования генома, включает в себя гидовую РНК (гРНК) и белок Cas9. С помощью белка Cas9 гРНК присоединяется к протоспейсеру – участку вирусной ДНК, соответствующему спейсеру гРНК (либо, в случае искусственной системы, участку целевого гена эукариотической клетки). После узнавания белок Cas9 разрезает цепь ДНК в одном строго определенном месте. Репарация ДНК в месте разреза может происходить по пути негомологичного соединения концов, в результате чего с большой частотой возникают мутации (а). Если же в клетку доставить искусственно синтезированную донорскую молекулу, которая соответствует участку разрыва, то таким образом можно произвести либо замену участка гена (б), либо направленную вставку трансгена (в). Таким образом, с помощью системы CRISPR-Cas можно исправлять генетические нарушения или вносить желаемые изменения

Изучение стратегий борьбы бактерий с бактериофагами, несмотря на свою кажущуюся фундаментальность и отвлеченность от задач практической медицины, принесло неоценимую пользу человечеству. Примерами этого могут служить методы молекулярного клонирования и редактирования геномов – направленного внесения или удаления мутаций и изменения уровня транскрипции определенных генов.

Благодаря быстрому развитию методов молекулярной биологии всего лишь через несколько лет после открытия механизма действия систем CRISPR-Cas была создана работающая технология геномного редактирования, способная бороться с болезнями, ранее считавшимися неизлечимыми. Доступность и простота этой технологии позволяют рассматривать ее как основу для медицины, ветеринарии, сельского хозяйства и биотехнологий будущего, которые будут базироваться на направленных и безопасных генных модификациях.

Нет никаких сомнений, что дальнейшее изучение взаимодействия бактерий и их вирусов может открыть перед нами такие возможности, о которых мы сейчас даже не подозреваем.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 16-34-01176)

Лумепатура
 Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Konermann S. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science*. 2016. V. 353: aaf5573.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. V. 315. P. 1709–1712.

Bikard D., Marraffini L. A. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages // *Curr. Opin. Immunol.* 2012. V. 1. P. 15–20.

Bondy-Denomy J., Garcia B., Strum S. et al. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins // *Nature*. 2015. V. 526. P. 136–139.

Calendar R., Abedon S. T. *The Bacteriophages* // 2nd Ed., Oxford University Press. 2006.

Datsenko K. A., Pougach K., Tikhonov A. et al. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR-Cas adaptive bacterial immunity system // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 945

Jiang W., Marraffini L. A. CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems // *Annu. Rev. Microbiol.* 2015. V. 69. P. 209–28.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. V. 337. P. 816–821.

Koonin E. V., Wolf Y. I. Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? // *Biol. Direct.* 2009. V. 4. P. 42.

Lopez-Pascua L., Buckling A. Increasing productivity accelerates host-parasite coevolution // *J. Evol. Biol.* 2008. V. 3. P. 853–860.

Makarova K. S., Wolf Y. I., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 11. P. 722–736.

Moineau, S., Pandian S., Klaenhammer T. R. Restriction/modification systems and restriction endonucleases are more effective on lactococcal bacteriophages that have emerged recently in the dairy industry // *Appl. Envir. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 197–202.

Neve H., Kemper U., et al. Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophage in a dairy plant // *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 1994. V. 46. P. 167–178.

Nuñez J. K., Harrington L. B., et al. Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity // *Nature*. 2015a. V. 527. P. 535–538.

Nuñez J. K., Kranzusch P. J., et al. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 528–534.

Nuñez J. K., Lee A. S., Engelman A., Doudna J. A. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity // *Nature*. 2015b. V. 519. P. 193–198.

Paez-Espino D., Sharon I., et al. CRISPR Immunity Drives Rapid Phage Genome Evolution in *Streptococcus thermophilus* // *MBio*. 2015. V. 6: e00262–15.

Shmakov S., Abudayyeh O. O., Makarova K. S., et al. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. // *Mol. Cell*. 2015. V. 60. P. 385–397

Tan D., Svenningsen S. L., Middelboe M. Quorum sensing determines the choice of anti-phage defense strategy in *Vibrio anguillarum*. // *mBio* 2015. V. 6: e00627–15.

Westra E. R., van Erp P. B., Küme T., et al. CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3 // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. P. 595–605.

В. В. ВЛАСОВ, В. В. МОРОЗОВА, Н. В. ТИКУНОВА

Правда о фаготерапии, или Памятка врачу и пациенту

Первые клинические эксперименты с бактериофагами начались сто лет назад. Казалось, что этот новый метод терапии обречен на успех: с научной точки зрения он выглядел безупречным, и результаты применения выглядели многообещающими.

Почему же в последующие десятилетия интерес к терапевтическому применению бактериофагов в мире упал? Почему он возник вновь, и почему эта замечательная идея до сих пор не реализована в полной мере? И практические врачи, и их пациенты сегодня должны четко представлять не только суть, но и все сильные и слабые стороны этого перспективного вида терапии

Бактериофаги – это не обычные лекарства. Они не являются простыми химическими веществами, как антибиотики и большинство других препаратов, но их вряд ли можно считать и полноценными живыми организмами, так как они, как и все остальные вирусы, могут размножаться только в клетке-хозяине. По сути, это нанороботы с генетической программой, способные проникнуть внутрь бактериальной клетки и там размножиться, разрушив ее.

Поэтому к бактериофагам не всегда применимы стандартные для фармакологии нормы и подходы. И хотя фаговые препараты сегодня производятся и используются в медицине, наши знания о многообразии этих вирусов, механизмах их взаимодействия с бактериями и конкуренции с себе подобными пока недостаточны, чтобы в полной мере использовать их мощный терапевтический потенциал.

Безопасно и эффективно

Фаготерапия родилась едва ли не сразу после открытия самих бактериофагов, однако широкие испытания этих противобактериальных средств начали проводиться в СССР только в конце 1930-х гг. В результате была доказана эффективность препаратов бактериофагов как профилактического средства при борьбе с эпидемиями дизентерии и холеры, а использование их при лечении ран и гнойно-воспалительных процессов показало их потенциал как альтернативы антибиотикам.

Однако результаты исследований тех времен были зачастую противоречивы: иногда фаги сразу подавляли развитие инфекционных процессов, но иногда оказывались бесполезными. Специалисты сразу поняли, в чем причина: лечение было успешным лишь тогда, когда использовались фаги, способные инфицировать именно тот бактериальный штамм, который и вызвал заболевание. Поэтому при возникновении эпидемии требовалось выделить инфекционный агент, проверить на нем имеющиеся фаговые препараты и запустить в производство в качестве лекарства наиболее эффективный бактериофаг.

К сожалению, результаты подобных исследований, проводившихся в СССР, не были должным образом документированы и описаны в научной литературе, к тому же они проводились по схемам, не соответствующим принятым на сегодня протоколам клинических испытаний. Тем не менее главные результаты этой работы были бесспорны: фаги доказали свою безопасность и высокую эффективность в реальных условиях и с тех пор используются в нашей стране в клинической практике наряду с обычными лекарственными средствами.

С появлением антибиотиков интерес к фагам на Западе был утрачен, но после появления антибиотикоустойчивых штаммов бактерий в разных странах начали разрабатывать фаговые препараты и проводить испытания, которые, по сути, повторяли исследования, уже проведенные в СССР. Результаты этих работ вновь



ВЛАСОВ Валентин Викторович – академик РАН, доктор химических наук, профессор, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат Государственной премии РФ (1999). Автор и соавтор более 300 научных работ, 20 патентов



МОРОЗОВА Вера Витальевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор более 30 научных работ, 6 патентов.



ТИКУНОВА Нина Викторовна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 120 научных работ, 21 патента

Ключевые слова: бактериофаги, фаготерапия, фагосодержащие лекарства,
Key words: bacteriophages, phage therapy, phage-based preparation

© В. В. Власов, В. В. Морозова Н. В. Тикунова, 2016



↓
Бакпосев для выявления патогенного микроорганизма

↑
Обработка раны фаговым препаратом



→
Подбор и наработка бактериофагов



В новосибирской клинике проводится экспериментальное лечение диабетической стопы – грозного осложнения диабета, которое может привести к гангрене, потере конечности и инвалидизации больного. Бактериальная инфекция является одним из факторов, вызывающих эту тяжелую патологию. При фаговой терапии диабетической стопы из больных тканей берут мазок для выявления конкретной бактерии-патогена. Затем из коллекции бактериофагов подбирают тот, который способен лизировать именно эту бактерию. Фаговый препарат наносят на стерильную салфетку, которую прикладывают к ране. Лечение длится около недели



АНТИБИОТИКИ

Достоинства:

широкий спектр действия;
простота патентования

Недостатки:

разрушают собственную микрофлору организма, что создает угрозу вторичных инфекций;
не способны концентрироваться в области инфекционного поражения;
вызывают побочные эффекты: аллергии, кишечные расстройства и т. д.;
приводят к возникновению бактериальных штаммов с лекарственной устойчивостью;
создание новых антибиотиков – длительный и дорогостоящий процесс

БАКТЕРИОФАГИ

Достоинства:

специфичность действия, для любой бактерии можно найти убивающий ее бактериофаг;
поиск нового фага занимает несколько дней или недель;
производство недорогое и экологически чистое;
не вызывают дисбактериоз;
не токсичны и не вызывают побочных эффектов;
после уничтожения патогенного агента элиминируются из организма

Недостатки:

слишком высокая избирательность – для гарантии успеха лечения нужно идентифицировать патоген;
патентование затруднено

ЗНАКОМЬТЕСЬ – ФЕКОТРАНСПЛАНТАЦИЯ

После лечения антибиотиками в кишечнике иногда происходит быстрое размножение агрессивной бактерии рода клостридий – *Clostridium difficile*, вызывающей тяжелейшую диарею, не поддающуюся медикаментозному лечению. Проблема настолько серьезна, что еще недавно от этой болезни в США погибали ежегодно тысячи больных. Лечить эту диарею научились совсем недавно и очень простым способом – вводя в кишечник больного фекальную микрофлору, взятую от здорового донора. Выздоровление часто наступает практически мгновенно, буквально на следующий день. Очевидно, при такой «пересадке» фекалий больной получает полный набор «правильных» микроорганизмов, уничтоженных антибиотиками, плюс бактериофаги, регулирующие численность патогенных штаммов.

Первоначально распространение метода в США сдерживалось FDA, которое пыталось использовать в его отношении принципы регулирования, принятые для обычных лекарств. Однако протесты терапевтов и больных наряду с очевидной безопасностью процедуры сыграли свою роль, и ее разрешили проводить, используя обычные меры предосторожности – выбор здоровых доноров и проведение процедуры специалистами в лечебных учреждениях. Этот метод лечения в последние несколько лет получил в США широкое распространение, давая хорошие результаты. Вероятно, только предубеждением врачей можно объяснить тот странный факт, что лечение фекоотрансплантацией сегодня практикуется не во всех европейских странах, а в России его можно получить только в Центре новых медицинских технологий в новосибирском Академгородке

подтвердили безопасность препаратов бактериофагов, что, в частности, отметило и Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA).

В Великобритании успешно проведены эксперименты по лечению бактериофагами хронического отита, вызванного нечувствительной к антибиотикам синегнойной палочкой *Pseudomonas aeruginosa*, а в рамках проекта *Phagoburn* семь медицинских центров Франции, Бельгии и Швейцарии проводят клинические испытания коктейля фагов для предотвращения инфекций при ожогах. Об испытаниях собственных оригинальных коктейлей фагов для лечения широкого спектра заболеваний сообщает и ряд американских фирм (*Intralytix*, *Enbiotix*, *AmpliPhi*). Правда ни одно из этих масштабных клинических испытаний пока не доведено до конца.

Что такое «медицинский бактериофаг»?

В России препараты бактериофагов можно приобрести в обычной аптеке. Но при этом нужно понимать, что в отличие от других лекарств с точной химической формулой и концентрацией действующих компонентов препарат бактериофага представляет собой нестандартный раствор, содержащий живые вирусные частицы. Даже препарат с одним и тем же названием, но произведенный на разных предприятиях или в разное время, может содержать отличающиеся комбинации и (или) пропорции фагов.

Все эти различия обусловлены самой спецификой процедуры отбора фагов и их производства. Бактериофаги отбирают по способности лизировать конкретный изолят бактерии, затем смесь фагов выращивают на заданной бактериальной культуре, а потом «запускают»



В жизненном цикле биопленки выделяют несколько стадий: первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия) (1); фиксация (окончательное прикрепление) с выделением внеклеточных полимеров (2); созревание, когда в колонии накапливаются питательные вещества, а клетки начинают делиться (3); дисперсия – выброс с поверхности биопленки микроорганизмов, которые могут стать родоначальниками новых колоний (4)

Чем менее вирулентен инфицирующий бактериофаг, тем больше шансов на то, что некоторые бактерии приобретут невосприимчивость, иммунитет к нему, станут устойчивыми к бактериофагной инфекции, и, наоборот, чем вирулентнее бактериофаг, тем меньше возможность возникновения устойчивых к бактериофагу рас бактерий. Из этих данных необходимо сделать следующий практический вывод: при употреблении бактериофагов для лечения различных инфекционных заболеваний людей или животных необходимо пользоваться только высоковирулентными в отношении возбудителя бактериофагами, которые обеспечивают максимальную гибель бактерий в организме больного. Использование маловирулентных бактериофагов может привести только к частичной гибели бактерий; остальные приобретут устойчивость к бактериофагу, и выздоровление будет задержано.

В основе устойчивости бактерий к бактериофагу наиболее часто лежит способность некоторых бактерий вырабатывать обильное количество обволакивающего слизистого вещества. Бактерия, защищенная слизью, становится недоступной для внедрения бактериофага. Последнему обстоятельству можно найти некоторую аналогию в простом эксперименте: если в бульонную культуру, где происходит бактериофагия, прибавить немного желатины, чтобы бульон стал слегка вязким, бактериофагия прекратится; произведи лишь бактериофаг не сможет, так как его проникновению препятствует наличие вязкой желатины вокруг бактериальных клеток.

Считается, что в естественной среде подавляющее большинство микроорганизмов, обитающих в условиях текучести на поверхности раздела двух сред, существует в виде «биопленок» – своеобразных «колоний» с особой пространственной и метаболической структурой. В таких «городах микробов» бактериальные клетки погружены во внеклеточный слизистый матрикс, формируемый полимерными веществами, выделяемыми самими клетками. Объект, к поверхности которого прикреплены биопленка, может быть как неживым (например, камни, катетеры, суставные протезы и др.), так и представлять собой часть живого организма (стенки кишечника, зубы, кожа и т. п.). Такая форма существования дает микроорганизмам массу преимуществ: благодаря слизистому матриксу микрофлора биопленки оказывается более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов самой разной природы, от ультрафиолетового излучения и дегидратации до антибиотиков. Матрикс защищает бактерии и от атак бактериофагов и иммунных клеток организма-хозяина

в производство, где бактериофаги размножают уже в больших емкостях-ферментерах с использованием «производственных» штаммов бактерий.

В результате получается препарат, который убивает вполне определенный бактериальный штамм. Например, «бактериофаг синегнойный» содержит фаги, которые поражают синегнойную палочку *P. aeruginosa*, но сколько и каких фагов находится в конкретном препарате, какие именно штаммы синегнойной палочки он способен поражать, и подойдет ли он конкретному пациенту, лечащему врачу не известно. Если больший зарезился тем же штаммом, на котором выращивали фаг, препарат сработает «отлично». В ином случае можно надеяться лишь на многокомпонентность фагового коктейля – хорошо, если в нем окажется бактериофаг, специфично действующий на патоген.

Поэтому покупать препарат бактериофага, чтобы лечиться самостоятельно, не стоит. Назначить лечение и выбрать лекарство должен специалист. Спектр заболеваний, которые можно лечить бактериофагами широк: трофические язвы, ожоговые и раневые инфекции, инфекции органов дыхания, мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта, остеомиелит и т. п. Возбудителями болезней во всех этих случаях служат такие печально известные бактерии, как золотистый стафилококк, включая лекарственно устойчивые штаммы, синегнойная палочка, патогенные формы кишечной палочки, сальмонеллы, протей, стрептококки и др. В принципе в природе можно найти бактериофаг против любой бактерии, включая возбудителей чумы и сибирской язвы. Можно применять бактериофаги и для профилактики бактериальных инфекционных болезней, например, они были успешно использованы в детских садах и школах для предотвращения эпидемии дизентерии.

Препараты бактериофагов используют либо местно, непосредственно в очаге поражения, либо принимают внутрь. В рекламных изданиях утверждается, что фаги способны распространяться в организме человека и проникать из желудка в кровоток, но четких и однозначных научных подтверждений этого пока нет. Напомним, что за словами «препарат бактериофага» скрываются очень отличающиеся между собой вирусы бактерий, и их судьба в организме может также сильно различаться.

В ряде случаев фагам трудно добраться до своих «жертв». Например, возбудители туберкулеза находятся внутри клеток самого организма, куда фаги не могут проникнуть, а ряд бактерий формируют биопленки, непроницаемые не только для фагов, но и для антибиотиков. В этом случае дополнительно используют ферменты, разрушающие биопленки, которые могут продуцироваться специально сконструированными фагами.

В инфицированном организме фаги размножаются, пока не погибнет большинство чувствительных к ним бактериальных клеток. Окончательное выздоровление больного, в организме которого произошла «битва» бактериофагов с бактериями, наступит, когда в полную силу заработает иммунная система, которая будет защищать человека еще долгое время независимо от присутствия патогена.

Кстати сказать, благодаря своей специфичности фаги не убивают «хорошие» микроорганизмы, т. е. в отличие от антибиотиков, не нарушают микробиом человека. На сегодня известно, что нарушение кишечной микрофлоры может приводить к тяжелым последствиям, от проблем с желудочно-кишечным трактом до аллергий и нарушений функций центральной нервной системы. Кроме того, бактериофаги не мешают применению других терапевтических средств и сами не повреждаются ими.

Каждому – персональный «коктейль»

Почему же бактериофаги пока не стали основным средством борьбы с инфекциями, а в социальных сетях пациенты жалуются на неудачные попытки лечения? Частично это объясняется использованием неадекватных препаратов. Десять лет назад множество «лечебных учреждений» рекламировали излечение от всех болезней препаратами «стволовых клеток», а сейчас не менее активно рекламируются экстракты из «бактерий, выделенных из вечной мерзлоты» и «препараты на основе бактериофагов», в которых сами фаги обнаружить не удастся. Покупая препарат, нужно быть уверенным в том, что его изготовил надежный производитель.

Основная же и главная причина неудач – неумелый подбор фагов для лечения конкретных пациентов. Каждый конкретный фаг эффективен против одного или максимум нескольких штаммов бактерий, а у разных пациентов схожая по внешнему проявлению инфекция, например, ангина может быть вызвана разными штаммами стрептококка. Чтобы вылечить больного, необходимо выделить культуру патогена и протестировать ее на чувствительность к конкретным фагам. То есть терапия бактериофагами должна проводиться с использованием принципов персонализированной медицины, к чему современная медицина практически не готова.

Опыт СССР, Грузии и Польши показал, что для успешного применения бактериофагов нужны не только клиника, но и производственно-лабораторный участок, располагающий коллекцией фагов и специалистами, способными идентифицировать бактерии, подбирать и выделять бактериофаги для конкретного пациента.



НА ПУТИ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ

В Новосибирском научном центре технологии персонализированного лечения бактериофагами развивает консорциум Института химической биологии фундаментальной медицины СО РАН и Центра новых медицинских технологий в содружестве с клиницистами из Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна и Дорожной клинической больницы.

В большой коллекции бактериофагов ИХБФМ СО РАН есть уникальные штаммы, способные бороться с недавно появившимися и уже получившими широкое распространение возбудителями больничных инфекций, такими как грамотрицательные бактерии *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* и др. Уже выделены и охарактеризованы фаги, обладающие литической активностью в отношении более широкого спектра бактериальных штаммов, в том числе антибиотикорезистентных, чем бактериофаги в коммерческих препаратах. К ним относятся бактериофаги синегнойной палочки, протеев, золотистого и эпидермального стафилококков, клебсиеллы, патогенных энтерококков. При расшифровке геномов наиболее перспективных бактериофагов выявлены штаммы, отличающиеся от известных ранее.

Совместно с клиницистами накоплен опыт применения бактериофагов для лечения инфекций, сопровождающих синдром диабетической стопы, остеомиелит и хирургические раневые инфекции. Есть случаи успешного излечения инфекций дыхательных путей, устойчивых к антибиотикам, а также инфекций мочеполовой сферы. Например,

Сотрудники лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) В. В. Морозова и Ю. Н. Козлова титруют препарат бактериофага

ингаляциями синегнойного бактериофага была полностью вылечена шестимесячная девочка с врожденным пороком развития гортани, у которой после установки трахеотомической трубки развился тяжелый трахеобронхит. Его возбудителем оказался штамм синегнойной палочки, устойчивый практически ко всем антибиотикам, рекомендованным для лечения грудных детей. Девочку дважды в день в течение недели лечили препаратами бактериофага. После исчезновения синегнойной палочки и прекращения инфекции трахеотомическую трубку убрали, и сейчас ребенок здоров. Что касается лечения хронических антибиотикорезистентных инфекций мочевыводящих путей, то выяснилось, что для достижения успеха препарат следует вводить непосредственно в полость мочевого пузыря. Так удалось добиться положительного результата при лечении пациентки с длительным послеоперационным хроническим циститом, вызванным целым «букетом» антибиотикоустойчивых энтеробактерий. Был подобран комплекс специфических бактериофагов, который и вводился больной ежедневно в течение 10 дней, после чего анализы мочи показали отсутствие патогенной микрофлоры.

Самое масштабное на сегодня производство бактериофагов для применения в медицине располагается в Российской Федерации. Широкий спектр фаговых препаратов выпускает НПО «Микроген», мировой лидер в этой области. Терапевтические бактериофаги производятся также в Грузии, в Международном центре фаготерапии имени Г. Элиавы (Тбилиси), где расположено не только промышленное производство, но и клиника с обширной коллекцией бактериофагов. С этим центром в рамках программы медицинского туризма сотрудничают клиники стран Европы и США, где фаготерапия пока не признана официальной медициной. В Польше, в Центре фаготерапии при Институте иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук препараты бактериофагов нарабатываются для экспериментального клинического применения при лечении пациентов, которым не помогают антибиотики

Но в таком случае имеет ли смысл масштабное производство фаговых препаратов? Ответ – да, потому что проблема узкой специфичности фагов частично решается производством фаговых коктейлей из нескольких (иногда десятков) разных фагов, поражающих разные штаммы целевого возбудителя. Ведь подобрать для больного нужный фаговый коктейль быстрее и проще, чем тестировать отдельные фаги из большой коллекции.

И все же не надо думать, что бактериофаги полностью заменят антибиотики – эти препараты дополняют друг друга, и применяться они должны в разных ситуациях. Когда больной находится в тяжелом состоянии, и есть уверенность, что причиной служит бактериальная инфекция, времени на эксперименты и подбор препаратов нет. Единственно правильное решение в этой ситуации – антибиотик широкого спектра действия.

Но в ситуации хронической инфекции или инфекции, вызванной бактериями со множественной устойчивостью к антибиотикам, предпочтение следует отдавать бактериофагу. В случае таких затяжных болезней, как отит, у врача есть время, чтобы использовать фаговый коктейль или специально подобрать фаг. Или же, когда после операции больной поражается антибиотикоустойчивым бактериальным штаммом, и его состояние быстро ухудшается, фаготерапия может стать единственным спасением.

Богатый опыт применения бактериофагов в клинической практике, накопленный за последние столетия, свидетельствует о перспективности фаговых медицинских технологий. Дальнейшая работа специалистов из множества компаний, работающих сегодня в этой области, и применение методов синтетической биологии обязательно приведут к созданию препаратов с несравненно большей эффективностью по сравнению с современными фаговыми коктейлями.

Однако имеется ряд причин, не связанных с наукой, которые тормозят прогресс создания и производства «медицинских» бактериофагов. Дело в том, что вирусы бактерий легко и просто размножить, что открывает широкие возможности контрафактного производства, ущемляющего экономические интересы добросовестного производителя. Пока не решен и вопрос о том, какие требования должны предъявляться к фагам как к терапевтическим препаратам. Ясно только то, что они должны отличаться от требований к синтетическим лекарственным веществам. Геномы бактериофагов разнообразны, а при персонализированном подходе они вообще должны подбираться индивидуально.

Тем не менее биотехнологи, также как ученые и медики, надеются, что безвредные и эффективные препараты все же займут свое законное место в арсенале терапии инфекционных заболеваний.

Литература

Алешкин А. В. *Бактериофаги в инфекционной патологии: прошлое, настоящее и будущее // Лекции по исследованию и применению бактериофагов*. 2016. Ульяновск. С. 11–51.

Бактериофаги: биология и применение. 2012. М.: «Научный мир». Ред.: Э. Каттер и А. Сулаквелидзе.

Козлова Ю. Н., Репин В. Е., Амищенко В. В., Власов В. В. и др. *Штамм бактериофага Pseudomonas aeruginosa, используемый в качестве основы для приготовления асептического средства против синегнойной палочки. // Патент РФ №2455355*. 2012.

Козлова Ю. Н., Морозова В. В., Тикунова Н. В. и др. *Штамм бактериофага Staphylococcus aureus SA20, обеспечивающий разрушение биопленок, образуемых бактериями рода Staphylococcus // Патент РФ № 2565824*. 2015.

Морозова В. В., Козлова Ю. Н., Тикунова Н. В. и др. *Штамм бактериофага Citrobacter freundii CF17, способный лизировать патогенные штаммы Citrobacter freundii // Патент РФ № 2565559*. 2015.

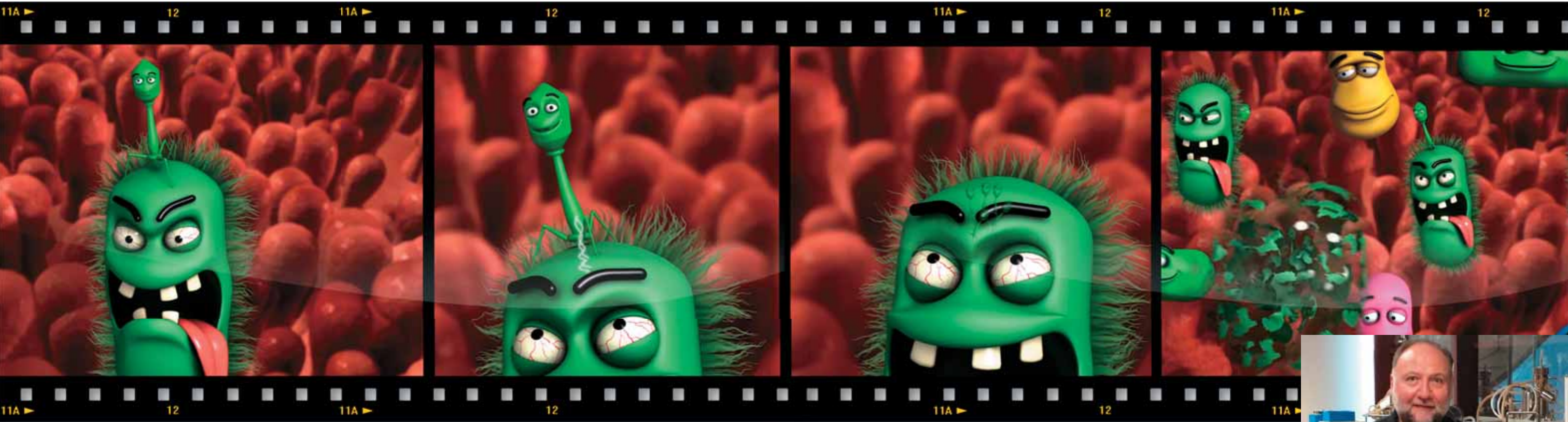
Тикунова Н. В., Морозова В. В. *Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // Acta Naturae*. 2009. № 3. С. 6–15.

Тикунова Н. В., Власов В. В. *Бактериофаги – враги наших врагов // Наука из первых рук*. 2013. № 2(50). С. 58–69.

Górski A. et al. *Phages targeting infected tissues: novel approach to phage therapy // Future Microbiol*. 2015. V. 10. P. 199–204.

Międzybrodzki R. et al. *Clinical aspects of phage therapy // Adv. Virus. Res*. 2012. V. 83. P. 73–121.

В публикации использованы иллюстрации из книги «Лечение ран бактериофагом» (М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1941. 57 с.)



ФАГОБИОТИКИ для здоровой жизни

Наше здоровье и долголетие тесно связаны со «здоровьем» микробиома – содружества микроорганизмов, обитающих в теле человека. На состояние этого важного «микробного органа», в свою очередь, влияют многие факторы – от антибиотиков до стресса. Использование бактериальных вирусов в виде пробиотиков для осторожного и направленного воздействия на микрофлору может стать профилактикой как тяжелых инфекционных болезней, так и неинфекционных, таких как дисбактериоз и некоторые виды рака. Это еще одно подтверждение того, что бактериофаги сегодня становятся технологической платформой, на которой можно потенциально разработать коммерческие продукты для самых разных целей, от лечения людей и животных до обеспечения безопасности пищевых продуктов

Ключевые слова: бактериофаги, фаготерапия, пробиотик, фагобиотик, фагосодержащие лекарства, фаговый биоконтроль.
Key words: bacteriophages, phage therapy, probiotics, phagebiotic, phage-based preparations, phage biocontrol

Несмотря на соблазн использовать бактериофаги во всех ситуациях, где задействованы бактериальные патогены, перед разработкой любого фагового продукта требуется провести тщательный и всесторонний анализ проекта, включая техническую осуществимость, стоимость, конкурентную среду и т. д. Важным фактором является и маркетинговая стратегия: некоторые фагосодержащие препараты лучше позиционировать как лекарства, однако другие можно использовать как биологически активные добавки-пробиотики, которые продаются без рецепта. Дело в том, что способность литических бактериофагов уничтожать определенные болезнетворные бактерии, не влияя на нормальную бактериальную флору, позволяет использовать их не только для лечения, но и для профилактики многих бактериальных заболеваний.

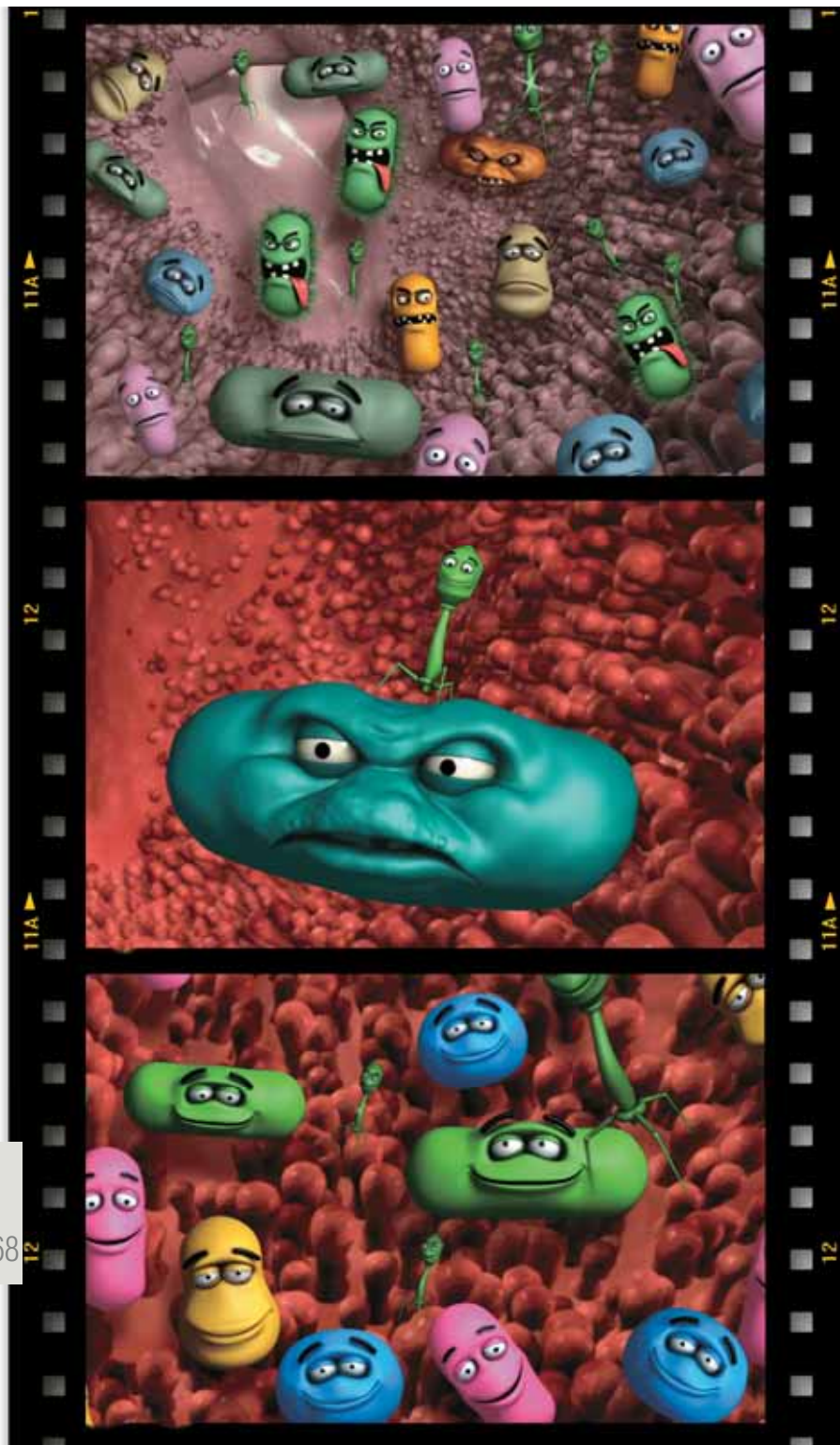
К примеру, фаговые препараты, мишень которых – патогены, вызывающие диарею, вполне могут стать биологически активной добавкой для профилактики таких острых кишечных инфекций, как шигеллез. Кстати сказать, об успешном применении фагов против *Shigella* spp. у людей свидетельствует ряд публикаций в научной литературе бывшего СССР (Goodridge, 2013). Такие пробиотики будут незаменимы для людей, много путешествующих по странам, где высока заболеваемость бактериальной диареей.

Более сложный сценарий подразумевает использование литических фагов для лечения, например, бактериальных осложнений ран, в которых участвует сразу несколько видов возбудителей. Эффективное лечение в этом случае требует комплексных фаговых препаратов, таких как грузинский *Pyobacteriophage* и российский «Пиобактериофаг комплексный» (производства НПО «Микроген»). В США успешно прошли испытания поливалентного препарата, содержащего восемь литических фагов против трех видов патогенных бактерий, характерных для инфицированных ран (кишечной палочки, золотистого стафилококка и синегнойной палочки (Rhoads *et al.*, 2009)). Производство и контроль за качеством подобных препаратов требует



СУЛАКВЕЛИДЗЕ Александр – кандидат биологических наук, главный научный сотрудник и вице-президент по исследованиям и развитию компании *Intralytix* (Балтимор, США). Международный эксперт по технологиям использования фагов, главный редактор журнала «Бактериофаг». Автор ряда публикаций по фаготерапии и биоуправлению и 14 патентов

© А. Сулаквелидзе



Литические бактериофаги направленно атакуют патогенные бактерии, обитающие в наших органах, включая слизистую кишечника, не трогая полезную микрофлору

гораздо больших усилий, поэтому их предпочтительнее разрабатывать и продавать как традиционное лекарственное средство.

И, конечно, стоимость разработки, стратегии нормативно-правового регулирования и временные рамки для коммерциализации разных продуктов будут также существенно различаться.

Оптом и под заказ

Фагосодержащие лекарства позволяют быстро и адекватно реагировать на появление новых высокоэффективных патогенных клонов и фагустойчивых мутантов в популяциях бактерий. Так как фаги эволюционировали совместно с бактериями более 3 млрд лет (Lenski, 1984), при необходимости из окружающей среды можно относительно легко выделить фаги со способностью убивать любую бактериальную «мишень».

С практической точки зрения для этого нужно проводить мониторинг чувствительности патогена и по мере необходимости обновлять фагосодержащие препараты. Что касается первого условия, то тестирование бактерий на чувствительность к антибиотикам – стандартная практика во всех крупных больницах. Эти процедуры можно достаточно легко адаптировать под бактериофаги, повысив пропускную способность оборудования и внедрив фагоспецифичные протоколы.

Однако с нормативной точки зрения возможны трудности. Обновление фаговых препаратов путем замены старых штаммов на новые, более эффективные, успешно проводилось в бывшем СССР и странах Восточной Европы. Но такая практика вновь для западных регулирующих органов, для которых каждое изменение в лекарственном препарате служит предметом нового нормативного применения. Такие требования будут препятствовать

Бактериофаги относятся к наиболее распространенным организмам на Земле:

– одна столовая ложка (около 15 мл) обычной природной воды содержит около 3×10^9 фаговых частиц (Bergh *et al.*, 1989);

– фаги присутствуют, часто в огромных количествах, во всех свежих, необработанных продуктах (мясном фарше, колбасе, мясе курицы, пресноводной и морской рыбе, сыром молоке, сыре и другой «здоровой пище», включая йогурт) (Sulakvelidze & Kutter 2005);

– фаги присутствуют в кормах для животных и домашних птиц и в других кормовых ингредиентах (Maciorowski *et al.* 2001).

– по численности фаги являются вторыми после бактерий компонентами нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (Breitbart *et al.* 2003; Sulakvelidze & Kutter 2005)

развитию новых эффективных средств на основе бактериальных вирусов, ориентированных на один или несколько патогенов (Sulakvelidze, 2012).

Позитивным моментом можно считать гибкость FDA (американского Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) в отношении использования фагов для обеспечения безопасности пищевых продуктов. FDA разрешило в будущем обновлять несколько таких препаратов в ответ на появление в пищевых продуктах новых фагустойчивых штаммов бактериальных патогенов (Woolston & Sulakvelidze, 2015). Может ли подобный подход быть реализован для лечения человека, еще предстоит выяснить. Однако делать это необходимо, иначе мы не сможем оптимально использовать в здравоохранении все сильные стороны фаготерапии.

Следующая проблема возникает в связи с ситуацией, когда фаги подбираются индивидуально для каждого пациента. Так как литические фаги высоко специфичны, коммерческие фаговые препараты могут оказаться недостаточно эффективными в отношении конкретных штаммов, преобладающих в той или иной больнице или выделенных от конкретного пациента, как было не раз показано советскими исследователями (Zhukov-Verezhnikov *et al.*, 1978). Один из подходов к решению этой проблемы – проверка всех выделенных штаммов бактерий на чувствительность к фагам в поисках наиболее терапевтически активных вирусов. Подобный тип «персонализированной медицины» приобретает в мире все большую популярность, в том числе и в отношении выбора наиболее эффективного антибиотика.

Таким образом, чтобы фаготерапия выбрала весь свой потенциал, фаги должны быть «сделаны на заказ». С технической точки зрения это вполне выполнимо: например, можно собрать большие библиотеки охарактеризованных литических фагов и разработать



технологии быстрого скрининга их активности против выделенных бактериальных патогенов. Но это потребует некоторого творческого мышления от регулирующих органов.

Наконец, необходимо продумать логистику, чтобы такой подход был еще и коммерчески жизнеспособным. Может оказаться целесообразным на первых порах создать небольшое количество опорных клиник или центров с хорошо подготовленным персоналом, где будут реализованы соответствующие технологии. Число (размер) этих центров может впоследствии возрасти по мере того, как персонализированный подход к лечению будет завоевывать все больше сторонников среди специалистов-медиков.

Фаги-пробиотики

Одно из самых интригующих потенциальных применений бактериофагов – использование их в качестве пробиотиков для тонкой настройки микрофлоры желудочно-кишечного тракта и (или) других органов – кожи, полости рта, влагалища.

Большая часть бактерий находится в желудочно-кишечном тракте, который колонизирован обильной и разнообразной микрофлорой, играющей важную роль не только в образовании фекалий, но и в защите слизистых оболочек, регуляции иммунологической толерантности и синтеза витамина К. Многочисленные факторы (лечение антибиотиками, неправильное питание, психологический и физический стресс и др.) могут вызывать изменения состава микрофлоры кишечника, что способствует развитию различных



Препараты на основе бактериофагов могут решить многие проблемы со здоровьем в качестве дополнения к бактериальным пробиотикам

Терапевтическое применение фагов пришло в упадок после того, как в 1940—1950-гг. стали широко доступны антибиотики. Фаготерапию продолжали практиковать лишь в странах бывшего СССР и Восточной Европы и, в гораздо меньшем масштабе, во Франции, Швейцарии и Египте (Sulakvelidze & Kutter 2005). За это время появилось несколько сотен публикаций относительно различных терапевтических применений бактериофагов, но большинство из них, опубликованные преимущественно в русских и грузинских биомедицинских журналах, были недоступны для западных специалистов. Сейчас ситуация постепенно улучшается: например, недавно было опубликовано на английском языке несколько обзоров ученых из стран бывшего Советского Союза и Восточной Европы (Alisky *et al.*, 1998; Sulakvelidze & Kutter, 2005)

хронических и дегенеративных заболеваний, включая ревматоидный артрит.

Один из подходов к лечению этих расстройств – использование препаратов с полезными, «пробиотическими» микроорганизмами, которые при попадании в организм в достаточных количествах препятствуют распространению потенциально патогенных штаммов и восстанавливают нормальный микробный баланс желудочно-кишечного тракта, улучшая общее состояние здоровья. Традиционно такие «коктейли» содержат различные бактерии (чаще всего лакто- и бифидо-) и продаются как пищевые добавки, а также в виде напитков, детских смесей и т. п. (Schrezenmeir & de Vrese, 2001). В наши дни бактериальные пробиотики завоевывают все большую популярность по всему миру.

Однако в качестве пищевых добавок-пробиотиков можно использовать и литические бактериофаги, поражающие «проблемные» бактерии. Основное различие между бактериальными и фаговыми пробиотиками заключается лишь в характере их воздействия на патогены: «пробиотические» бактерии не допускают или препятствуют заселению органа опасными «интервентами», а фаги просто убивают их. При этом на микрофлору в целом фагобиотики должны будут действовать очень щадяще благодаря своей высокой активности лишь в отношении конкретных видов бактерий. Кроме



того, подобные препараты должны быть совместимы (по сути, синергичны) с бактериальными пробиотиками. Такой подход может служить в качестве платформы для разработки нового класса «супер пробиотиков».

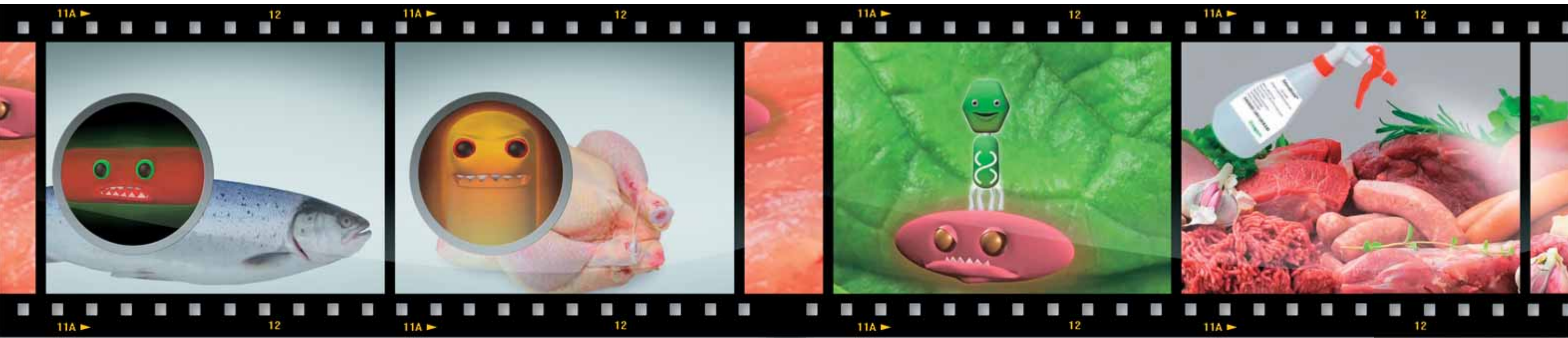
И дело даже не в названии: важно то, что фагобиотики могут решить многие потенциальные проблемы со здоровьем, так как их можно использовать в качестве новых средств профилактики таких значимых инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, как, например, шигеллез, кариес, вызываемый *Streptococcus mutans*, кожные и глазные болезни (угри, хронический блефарит и эндофтальмит, вызываемые *Propionibacterium acnes*), «женские болезни» (бактериальный вагиноз, вызываемый *Fusobacterium nucleatum*).

Фагобиотический подход также открывает возможности профилактики неинфекционных заболеваний, таких как ожирение и некоторые виды рака, развитие которых, как показывают современные исследования, могут провоцировать определенные бактерии желудочно-кишечного тракта. К таким бактериям относятся, на пример, *E. coli* типа B2, *Bacteroides fragilis* и *Salmonella Typhi*, которые иногда так и называют «онкобактерия-

Производственная база американской биотехнологической компании *Intralytix, Inc.* (Балтимор, США). Фото автора

ми». И действительно, на сегодня установлена тесная связь гепатобилиарного рака (рака печени и желчных путей) с хронической инфекцией желчного пузыря, вызываемого этой сальмонеллой (Dutta *et al.*, 2000). Фаги, которые будут нацелены на такие бактерии, могут в принципе снизить частоту возникновения некоторых видов злокачественных опухолей.

Наконец, бактериофаги можно использовать и как уникальный инструмент для исследований функциональной организации микробиомов млекопитающих. Например, с их помощью можно уничтожить или значительно уменьшить численность специфических видов бактерий в желудочно-кишечном тракте лабораторных животных, что будет «пробиотической версией» так называемого *генетического нокаута*. Изучив последовавшие за этим вмешательством местные и системные физиологические изменения, можно оце-



нить роль этих бактерий в микробиоме и их значимость для поддержания здоровья. Никакие другие доступные в настоящее время антибактериальные агенты не дают такой возможности «прицельно» изучить конкретную подгруппу бактерий.

Фаговый биоконтроль

Медленно, но неуклонно завоевывает признание в США и концепция использования бактериофагов для обеспечения безопасности пищевых продуктов. Все больше производителей пищевых продуктов признают преимущество использования бактериальных вирусов; о бактериофагах и их широком распространении в окружающей среде больше узнают и сами потребители.

С помощью фагов можно действительно безопасным и экологически чистым способом снизить количество патогенных бактерий (листерий, патогенных штаммов кишечной палочки, сальмонелл и др.) в пищевых продуктах без потери их питательной ценности и с сохранением нормальной, часто полезной микрофлоры. Для этого к продуктам добавляются (к примеру, распыляются по поверхности) соответствующие литические бактериофаги в нужной концентрации. Если бактерий-мишеней в продуктах не появится, то со временем фаги просто исчезнут.

За последние годы FDA уже одобрила несколько таких препаратов для обеспечения безопасности пищевых продуктов (Sulakvelidze, 2012; Woolston & Sulakvelidze, 2015). Первым официально признанным фагосодержащим препаратом для пищевых продуктов (в том числе готовых к применению) стал *ListShield* от компании *Intralytix, Inc.* Кстати сказать, он является на сегодняш-

ний день единственным препаратом на основе фага, одобренным FDA в качестве пищевой добавки. Препарат активен в отношении бактерии *Listeria monocytogenes*, вызывающей тяжелое заболевание, которое у людей со слабым иммунитетом может приводить к серьезным осложнениям и даже летальному исходу.

Еще нескольким фагосодержащим препаратам для пищевых продуктов присвоен статус GRAS (*Generally Recognized As Safe* – «в целом признаны безопасными»). Вероятно, что большинство, если не все, фагосодержащие препараты для обеспечения безопасности пищевых продуктов (а, возможно, и для «пробиотических» приложений) будут продаваться в США именно в этом статусе.

Большинство фаговых препаратов для обработки пищевых продуктов (в том числе *ListShield*) не содержат консервантов и не изменяют состав, вкус, аромат и цвет продуктов. Некоторые из них являются кошерными и халяльными и входят в список «органических материалов» международной некоммерческой организации *National Review Institute*, которая определяет условия, необходимые для качественного производства и переработки органической продукции. По сути, эти фаговые препараты признаны пригодными для использования в производстве органических пищевых продуктов (Woolston & Sulakvelidze, 2015).

Чтобы фаготерапия стала широко доступной во всем мире, безусловно, необходимо решить ряд технических и других проблем (Sulakvelidze & Kutter, 2005; Sulakvelidze, 2011). Однако, учитывая уже имеющийся потенциал бактериофагов для безопасного и эффективного лечения заболева-

ний, вызванных бактериями со множественной лекарственной устойчивостью, давно назрела необходимость приложить все усилия по внедрению этого природного антибактериального подхода в современную медицину.

Что касается пробиотического использования фагов, то в течение ближайших лет будет, очевидно, разработано несколько таких препаратов, и начать можно с фагобиотиков для профилактики и лечения диареи четко установленной бактериальной этиологии (например, того же шигеллеза). В конечном счете фагобиотический подход может быть использован для поддержания нормальной бактериальной флоры в целом, что будет служить профилактикой многих болезней, в том числе неинфекционной природы. В этом смысле фаги смогут играть важную роль в нашей жизни, представляя собой уникальный инструмент для изучения, тонкой настройки и укрепления важнейшего «микробного органа» нашего организма.

В пищевых продуктах могут содержаться бактерии, вызывающие кишечные инфекции. Чтобы снизить вероятность заражения, их можно обрабатывать фаговыми препаратами, прицельно убивающими только патогены

Литература

Alisky, J., K. Iczkowski, A. Rapoport and N. Troitsky. *Bacteriophages show promise as antimicrobial agents* // *J. Infect.* 1998. V. 36(1). P. 5–15.

Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak and M. Haldal. *High abundance of viruses found in aquatic environments* // *Nature.* 1989. V. 340(6233). P. 467–468.

Breitbart, M., I. Hewson, B. Felts, et al. *Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces* // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185(20). P. 6220–6223.

Lenski, R. E. *Coevolution of bacteria and phage: are there endless cycles of bacterial defenses and phage counterdefenses?* *J. Theor. Biol.* 1984. V. 108(3). P. 319–325.

Maciorowski, K. G., S. D. Pillai and S. C. Ricke. *Presence of bacteriophages in animal feed as indicators of fecal contamination* // *J. Environ. Sci. Health.* 2001. V. 36(5). P. 699–708.

Rhoads, D. D., R. D. Wolcott, M. A. Kuskowski, et al. *Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial* // *J. Wound Care.* 2009. V. 18(6). P. 237–238, 240–233.

Sulakvelidze, A. *Challenges of bacteriophage therapy.* *Industrial Pharmaceutical Microbiology* // N. Hodges and G. Hanlon. Passfield, England, Euromed Communications, Ltd. 2012. S13.11–S13.20.

Sulakvelidze, A., E. Kutter. *Bacteriophage therapy in humans.* *Bacteriophages // Biology and Application.* E. Kutter, A. Sulakvelidze. Boca Raton, FL, CRC Press. 2005. P. 381–436.

Woolston, J., A. Sulakvelidze. *Bacteriophages and food safety eLS.* Chichester, John Wiley & Sons, Ltd. 2015.

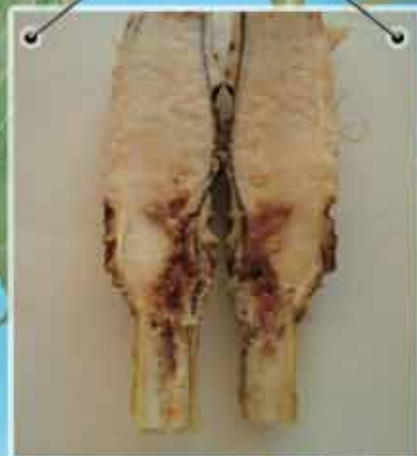
Zhukov-Verezhnikov, N. N., L. D. Peremitina, E. A. Berillo et al. (1978). *Therapeutic effect of bacteriophage preparations in the complex treatment of suppurative surgical diseases* // *Sov. Med.* 1978. V. 12. P. 64–66.

Иллюстрации предоставлены автором

К. А. МИРОШНИКОВ

ФАГИ НА ГРЯДКАХ

Проблемы и перспективы применения бактериофагов в растениеводстве



Встреча с бактериями зачастую заканчивается катастрофой для растения – разрушением тканей, поражением корневой и сосудистой систем. И даже когда бактериоз не приводит к непосредственной гибели, развитие растения замедляется, снижается его урожайность, теряется товарный вид плодов. Для контроля над фитопатогенными бактериями достаточно долго и вполне успешно использовали специальные сельскохозяйственные препараты – как правило, неочищенные и удешевленные версии медицинских антибиотиков стрептомицинового и тетрациклинового ряда. Однако этот путь весьма опасен и непредсказуем по последствиям с точки зрения как глобальной экологии, так и нашего здоровья

Слева: бактериальный ожог и стеблевая гниль растения подсолнечника, вызванные *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Эта бактерия поражает также корневую систему, которая некротизирует и загнивает, так как выделяемый бактерией высокомолекулярный полисахарид приводит к закупорке сосудов. Это заболевание, впервые описанное в 1981 г. в США, в последние годы получает все более широкое распространение. Фото подсолнухов: © Creative Commons



МИРОШНИКОВ Константин Анатольевич – доктор химических наук, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Москва), научный консультант Исследовательского центра «ФитоИнженерия» (Московская обл., Рогачево). Автор и соавтор 44 научных работ

Действие фитопатогенных бактерий наносит значительный урон мировому сельскому хозяйству. Борьба же с такими инфекциями всегда непростая. Как правило, сельскохозяйственно значимые растения выращиваются на больших площадях, и в этом случае индивидуальный мониторинг и обработка каждого растения – процесс очень трудоемкий и дорогой, если вообще возможный. В растениеводстве борьба с сорными растениями, вредоносными насекомыми и грибами осуществляется путем сплошной обработки полей препаратами соответствующих гербицидов, пестицидов и фунгицидов.

В последнее десятилетие мировое медицинское сообщество бьет тревогу в связи со стремительным распространением разновидностей (*штаммов*) болезнетворных бактерий, устойчивых к нескольким классам

Ключевые слова: болезни сельскохозяйственных растений, бактериофаг, фаготерапия, белковая инженерия, энзимология, молекулярная диагностика.

Key words: diseases of agricultural plant, bacteriophage, phage therapy, protein engineering, enzymology, molecular diagnostics

© К. А. Мирошников

применяемых в клинической практике антибиотиков. Инфекции, вызванные такими бактериями, приводят к тяжелейшим осложнениям, затрудняют и затягивают лечение болезней, приводя к тысячам смертей и колоссальным экономическим потерям.

Важно отметить, что наибольшую опасность представляют внутрибольничные инфекции, вызванные штаммами, которые циркулируют в медицинских учреждениях: подвергаясь постоянному давлению в результате применения противомикробных препаратов, эти бактерии приспосабливаются к ним, приобретая множественную устойчивость к антибиотикам.

Вероятность подхватить подобную антибиотикоустойчивую инфекцию «на улице» пока что сравнительно невысока, так как медицинские антибиотики оказывают влияние на окружающую среду лишь в местах своего постоянного использования. Однако этот «недостаток» с лихвой перекрывается антибиотиками сельскохозяйственными, десятки тысяч тонн которых ежегодно используются в мире для борьбы с бактериозами животных и растений. Именно со злоупотреблением сельскохозяйственными противомикробными препаратами связывают массовое появление «условных патогенов» – распространенных в природе бактерий, не представляющих особой опасности для здорового человека, но способных поражать людей с ослабленным иммунитетом. При этом в силу антибиотикоустойчивости избавиться от них почти невозможно.

Поэтому законодательные меры по ограничению использования антибиотиков в сельском хозяйстве, особенно не в лечебных, а в профилактических целях, – весьма разумный шаг с точки зрения мирового здравоохранения. И в свете этой ситуации ориентация на «зеленое растениеводство», направленное на максимальное сохранение урожайности и разнообразия растительных культур при минимальном использовании ксенобиотиков, становится не столько модой, сколько рациональным ответом на существующие вызовы.

На пути к зеленому земледелию

Зеленое земледелие – это вовсе не граничащие с идиотизмом концепции типа «пусть наши овощи корявенькие и со средневековой урожайностью, зато на навозе выращенные, и все червячки руками удалены». Это гармоничное сочетание современных достижений сельскохозяйственной науки: новых устойчивых и урожайных сортов, современной механизированной агротехники, рассчитанного применения комбинаций органических и неорганических удобрений, мониторинга урожайности и заболеваемости, технологичного хранения и переработки урожая. В комплекс таких мер входит и научно

обоснованное адаптированное применение биологических средств контроля.

Под *биоконтролем* мы понимаем использование живых организмов – специфических хищников или паразитов – для подавления популяций вредителей в сельскохозяйственных угодьях. В частности для борьбы с бактериальными инфекциями растений представляется привлекательной стратегия использования *бактериофагов* – бактериальных вирусов, нацеленных на конкретные патогены. Эта концепция имеет много достоинств. Фаги – естественные обитатели тех же экологических ниш, что и бактерии; соответственно, их использование не влияет на состояние крупных экологических систем. Их селекция и применение логичны, сравнительно просты и недороги. Сельскохозяйственную «фаготерапию» можно сочетать с большинством других методов химического и биологического контроля, при этом она безопасна как для самих растений, так и для человека и животных.

Однако следует иметь в виду, что фаговый фитоконтроль – не панацея против растительных патогенов. Для успешного внедрения любой фаготерапии, в том числе и растительной, требуется детальное понимание биологии и геномики бактериофагов и целевых микроорганизмов, изучение их взаимодействия, селекция подходящих фагов. Научоемкость этого метода кажется, на первый взгляд, пугающей. Но насколько эти опасения реалистичны, и каковы перспективы у сельскохозяйственной фаготерапии?

Как все начиналось

Когда в начале XX в. Ф. д'Эрелль предложил вирусную теорию инфекционного лизиса бактерий, то по мере осознания и принятия этой теории у исследователей во всем мире рос энтузиазм по поводу перспектив применения бактериофагов. Ведь это было время до открытия и массового применения антибиотиков, ставших позднее «золотым стандартом» лечения бактериальных инфекций. В 1920–1930-х гг. эффективных методов контроля заболеваний, вызванных бактериями, практически не существовало, и немудрено, что фаги сразу начали тестировать как терапевтические агенты для лечения практически всех известных заболеваний микробиологической природы.

Самые ранние задокументированные эксперименты по контролю и лечению бактериальных болезней растений были проведены в Университете штата Мичиган (США). В 1924 г. У. Молман и К. Хемстрит показали, что фильтрат из тканей капусты, пораженной *Xanthomonas campestris*, способен подавлять рост патогена в лабораторных условиях. На следующий год Д. Котила и Д. Кунс показали, что фаги, специфические против возбудителя черной ножки картофеля, можно



Возбудитель сосудистого бактериоза *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* развивается на всех крестоцветных культурах, включая турнепс (слева), но наибольший ущерб наносит цветной и белокочанной капусте (справа)

выделить непосредственно из почвы. При нанесении на клубни картофеля и корнеплоды моркови одновременно бактериофага и возбудителя этой болезни – бактерию *Erwinia carotovora* (современное название *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), гниение происходило только в тех пробах, где отсутствовал фаг.

В 1934 г. английский исследователь Р. Месси дал объяснение интригующему факту, что частота и интенсивность болезни хлопчатника – так называемого «бактериального ожога», вызываемой бактерией *Xanthomonas malvacearum*, была меньше на землях, которые затоплялись водами Нила. Он предположил, что основной причиной ограничения интенсивности болезни являются фаги, приносимые речными водами, и на следующий год доказал свою гипотезу, обнаружив фаги в почве только затопляемых участков.

Несмотря на эти результаты, ранние работы дали немного для понимания того, как действуют бактериофаги в природных условиях, а на каждую успешную попытку фаготерапии приходилось множество неудачных. На тот момент сведений о том, как выделять, характеризовать, культивировать и применять бактериофаги в медицине и в сельском хозяйстве было явно недостаточно.

Новый виток интереса к бактериофагам, произошедший в 1960–1970-х гг., был вызван удобством манипуляций с этими микроскопическими организмами. На примере бактериофагов были открыты и описаны многие фундаментальные процессы, составляющие ныне классику молекулярной биологии. Однако прикладному применению фагов внимания в то время уделялось значительно меньше, что и неудивительно

при тогдашнем тотальном доминировании антибиотиков для лечения бактериальных инфекций в медицине, ветеринарии и растениеводстве.

В основном такие эксперименты предпринимались в Японии – стране, не участвовавшей в первом этапе исследования фагов. И хотя в научной печати того времени встречается ряд успешных докладов о применении фаготерапии, в том числе и в сельском хозяйстве, попытки обобщить эти данные и выработать общую концепцию развития не увенчались успехом. Некоторые исследователи, более того, задавались вопросом: как вообще могли быть получены воспроизводимые положительные результаты? В условиях повсеместного внедрения в сельском хозяйстве антибиотиков и других химических агентов (например, соединений меди) использование фагов для лечения болезней растений казалось излишне сложным и малоперспективным.

С тех пор, несмотря на рост информации о строении, генетике и механизмах действия бактериофагов, интерес к ним в контексте их применения для лечения бактериозов растений остается на постоянном, относительно невысоком уровне. Ежегодно в микробиологических и сельскохозяйственных журналах публикуется несколько работ об успешных случаях фаготерапии того или иного сочетания «растение-патоген», предлагается состав фагового препарата, который иногда даже патентуется и производится промышленно (например, «Мультифаг» в Белоруссии и «Пентафаг-С» на Украине). Однако резонанс таких публикаций и коммерческий успех препаратов невелики, так как до сих пор нет ответов на многие логичные вопросы, задаваемые скептиками.



Всеми любимый картофель подвержен целому ряду бактериозов.

Вверху: картофель, пораженный черной ножкой, вызванной бактерией *Dickeya solani*; *внизу:* клубни, пораженные мягкой гнилью, вызванной бактерией *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Узкий спектр инфекционного действия фагов принципиально контрастирует с широким спектром антибиотиков. Существует обоснованное мнение, что если болезнетворный агент точно не определен, то фаги, скорее всего, не сработают. Поэтому чрезвычайно важным этапом использования фаготерапии является высокоточная диагностика патогена (до группы штаммов). Учитывая, что у растений схожие признаки болезни могут проявляться при инфицировании разными микробиологическими агентами, а методы сельскохозяйственной диагностики значительно менее развиты по сравнению с медицинской, это требование зачастую считается критическим ограничением.

Следующее ограничение – быстрая приспособляемость бактериальных патогенов. Оппоненты фаготерапевтических приложений всегда упоминают возможность того, что бактерия мутирует и станет устойчивой к индивидуальным фагам. Действительно, в классических экспериментах С. Луриа и М. Дельбрюка показано, что вероятность мутации, обуславливающей устойчивость к фагу, составляет около 10^{-9} . То есть в любой крупной бактериальной популяции через короткое время обязательно появится мутант, который не будет инфицироваться этим бактериофа-

гом. Поэтому использование бактериофагов в большой экологической системе способно только затормозить развитие заболевания, но не остановить его полностью.

Еще один фактор, который надо учитывать, – сложность микробных сообществ. Помимо уже упомянутой возможности бактерий, различных по происхождению, вызывать заболевания со сходными симптомами, существует вероятность, что в инфекции участвует сразу несколько штаммовых групп одного или близких патогенов. Многие фитопатогены не изучены современными методами, и случаются ситуации, когда бактерии с одинаковым комплексом морфологических и биохимических свойств генетически достаточно сильно отличаются.

Например, вызывающая бактериальную пятнистость томатов и перца бактерия *Xanthomonas campestris* pv *Vesicatoria*, ранее считавшаяся отдельным видом, представляет собой смесь по крайней мере четырех разных видов, каждый из которых вносит свой вклад в развитие и проявление симптомов заболевания. В силу высокой специализации бактериофагов их применение против таких не охарактеризованных микроорганизмов с высокой вероятностью может закончиться неудачей.

Принято считать, что для успешной фаготерапии концентрация фага должна быть высокой. Действительно, для эффективного контроля фаги должны присутствовать в количестве, превышающем некий порог по отношению к целевой бактерии (*множественность инфекции*). В большинстве публикаций фигурируют цифры 10^6 – 10^8 частиц/мл в зависимости от плотности популяции бактерий. При концентрации ниже этих величин терапевтическое действие будет незначительным. Однако производство препаратов бактериофагов с высокой концентрацией для опрыскивания полей будет, скорее всего, экономически неоправданным.

Кроме того, независимо от соотношения концентрации фага и бактерии, для успешного применения фаговых препаратов необходимо, чтобы целевой микроорганизм был физически доступен для фага. В экологической микробиологии имеется термин «пространственное убежище», под которым подразумевается первоочередной способ, с помощью которого микроорганизм скрывается от сторонней атаки. Популяции бактерий на поверхности растений (*филлосфере*) и в слое почвы, прилегающем к корневой системе (*ризосфере*), весьма неоднородны по своей плотности, а также способны физически перемещаться. Вирусы же не могут передвигаться самостоятельно, поэтому даже при высокой концентрации бактериофагов в препарате их проникновение внутрь тканей растения очень проблематично.

Отдельно нужно отметить уязвимость фаговых частиц. Полевые и лабораторные исследования показали, что вирусы инактивируются при высоких температурах,

высоких и низких показателях кислотности среды, а также под действием солнечной радиации, недостаточной или избыточной влажности. Таким образом, условия, естественные для филлосферы, оказываются губительными для фагов, и в течение короткого времени популяция бактериофага на обработанном растении резко уменьшается. При внесении бактериофагов в почву срок их циркуляции увеличивается, достигая нескольких дней, а небольшие размеры позволяют им вместе с потоком жидкости непосредственно проникать в сосудистую систему растений.

Но если фаг не найдет целевую бактерию, чтобы размножиться, то срок его «жизни» в коллоидном растворе будет ограничен. И хотя частицы бактериофагов полностью биоразлагаемы и не накапливаются в окружающей среде, как потерявшие активность антибиотики и химические средства защиты, короткий срок существования (*персистенции*) фага на поверхности растения и почве в естественных условиях является важным фактором, практически исключающим возможность их профилактического применения.

Перечисленные сложности, несомненно, объективны. Но настолько ли они непреодолимы, как представляют противники этого метода? Как правило, для каждой из этих высказанных проблем имеются свои пути решения.

Решаем проблемы

Для преодоления узости инфекционного спектра фагов применяется предварительный скрининг, при котором проводится селекция фагов с более широким диапазоном действия или подбирается композиция нескольких фагов, покрывающая наиболее вероятный диапазон патогена или комплекса патогенов. Такой подход используется при компоновке медицинских фаговых препаратов – и тех, которые выпускаются много лет в России и Грузии, и тех, которые начали создаваться недавно в ряде стран мира. Иногда в стремлении охватить максимальное число возможных бактерий в препараты включают 30–40 разных бактериофагов.

Впрочем, такое решение имеет и обратную сторону: при наличии в одном препарате большого числа разных фагов в высокой концентрации возможно их взаимодействие между собой – агрегация, неспецифическая адсорбция, неспецифическая рекомбинация. По мнению многих исследователей, занимающихся созданием фаговых композиций, оптимальное число различных бактериофагов в препарате составляет 5–10 штаммов.

Сочетание в одном препарате нескольких фагов, поражающих один и тот же патоген, – важный шаг в направлении преодоления бактериальной устойчивости к бактериофагам. Механизмы возникновения подобной устойчивости у бактерий достаточно неплохо изучены,

Пять «против»

Существует ряд фундаментальных ограничений, вытекающих из биологии взаимодействия вируса и его хозяина, которые осложняют проведение фаготерапии и служат основой для критики разной степени обоснованности.

Важнейшее ограничение бактериофагов – их высокая инфекционная специализация по отношению к бактериям-хозяевам. Каждый вид (клон, раса) бактериофагов инфицирует достаточно узкую группу штаммов внутри таксономического вида бактерий в зависимости от молекулы-рецептора на поверхности бактерии, к которой вирус присоединяется, адаптации к циклу обмена веществ бактерии-хозяина и ряда других факторов. Фаги, способные паразитировать на бактериях разных видов или родов, встречаются крайне редко, причем бактерии, инфицируемые такими фагами, обычно близкородственны.

так что можно даже проводить искусственную селекцию фагов против бактерий, возникших в результате наиболее вероятных мутаций.

Например, для бактерии наиболее быстрое и эффективное защитное решение состоит в «потере» или изменении рецептора, к которому присоединяется бактериофаг. Рецепторами могут служить различные молекулы на поверхности бактерий: белки *тилей* (половых ворсинок) и транспортных каналов, поверхностные полисахариды и пептидогликаны. Исключение этих молекул из обмена веществ бактериальной клетки часто оказывает сильное влияние на ее жизнеспособность: многократно отмечено, что фагоустойчивый мутант патогенной бактерии менее агрессивен, и микроорганизму-хозяину, в свою очередь, легче с ним справиться. Если же препарат будет содержать несколько фагов, использующих разные рецепторы, то, во-первых, вероятность возникновения мутанта, устойчивого ко всем фагам, снижается; во-вторых, образовавшийся мутант будет еще менее болезнетворным.

При всем колоссальном разнообразии микроорганизмов в природе в качестве значимых патогенов растений выступает большое, но все же ограниченное число бактерий и их штаммов. Для большинства из них уже разработана или принципиально возможна современная молекулярная диагностика (ПЦР и иммунохимическими методами). Несмотря на более высокую стоимость, такая диагностика точнее и быстрее по сравнению с традиционными микробиологическими методами. Поэтому организация регулярного микробиологического мониторинга или оборудование собственной диагностической лаборатории — оправданное решение для крупных сельскохозяйственных предприятий.

Подбор панели бактериофагов, способных инфицировать фитопатогены, которые наиболее часто встречаются на определенных культурах в определенной местности, — задача большая, но не бесконечная. В последние годы появился термин «персонализированная медицина», в том числе подразумевающая персонализированный подбор лекарственных средств с учетом возбудителя заболевания и состояния пациента.

В растениеводстве диагностика и обработка каждого растения практически невозможны. Однако если речь идет об обработке больших площадей на одной территории, засеянных одной культурой, с единым источником посевного материала, то в таких масштабах проведение диагностического мониторинга, подбор и производство фагового препарата, адаптированного именно под этот патоген, — вполне реалистичные действия, укладываемые в концепцию «наукоемкого сельского хозяйства».

Для поддержания необходимой концентрации фаготерапевтических агентов и увеличения времени действия фагового препарата в последние годы было

В печати встречаются публикации о применении в растениеводстве «фаголизин» — фаговых белков-ферментов, разрушающих бактериальные клетки. Но эти результаты выглядят скорее как курьез, так как здесь беспорядком ограничивающим фактором служит довольно высокая стоимость рекомбинантных белков и необходимость в точечном нанесении подобных препаратов. И даже когда эффективность того или иного ферментного препарата доказана на нескольких экземплярах комнатных растений, трудно представить себе человека, гуляющего с кисточкой по бескрайнему картофельному или кукурузному полю в поисках мест поражения бактериальными патогенами

предложено несколько остроумных решений. Довольно известным методом биологического контроля в растениеводстве и средством биоремедиации почвы служит применение непатогенных бактерий, как правило, родов *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Rhizobacterium* и *Pseudomonas*. При внесении в почву они служат антагонистами патогенных микроорганизмов, препятствуя их размножению и переносу инфекции на растения. Этот подход также имеет ряд фундаментальных ограничений, но достаточно успешно применяется в сельском хозяйстве.

По мере накопления знаний о биологии бактериофагов выяснилось, что некоторые из этих бактерий могут быть промежуточным хозяином для фагов, активных в отношении их близких патогенных «родственников». Литическая активность таких фагов существенно ниже, но зато их концентрация в ризосфере при одновременном внесении с бактериями-антагонистами будет дольше поддерживаться на постоянном уровне, чем при внесении одних только фагов.

Например, некоторые штаммы бактерии *Pantoea agglomerans*, служащие антагонистом патогенной для плодовых деревьев *Erwinia amylovora*, могут быть промежуточным резервуаром фагов, высоко инфекционных по отношению к этой бактерии. Эффект применения такого комбинированного препарата был сравним с действием стрептомицина (Balogh *et al.*, 2010). В другой работе описано успешное применение в почве неагрессивного штамма *Ralstonia* как промежуточного носителя фага против патогена пасленовых культур *R. solanacearum* (Fujiwara *et al.*, 2011). Дальнейшим развитием этого подхода может быть селекция фагов,

способных размножаться с низкой эффективностью на бактериях, входящих в нормальную флору почвы.

Для упрощения и удешевления использования как бактериофаги, так и бактерии-антагонисты обычно применяются в виде культуральных растворов. Однако при таком подходе достаточно сложно обеспечить необходимую концентрацию и жизнеспособность действующих агентов при хранении препарата.

В последнее время разработаны технологически и экономически эффективные методы заключения популяций бактерий и бактериофагов в полимерные капсулы, что стабилизирует биопрепарат и обеспечивает его постепенное высвобождение в ризосферу. Обработка посевного материала такими инкапсулированными препаратами обеспечит защиту от патогенов на ранних стадиях развития растения.

Для внедрения фагоконтроля заболеваний растений в современное сельскохозяйственное производство очень важно иметь четкое понимание, в каких агротехнических ситуациях применение бактериофагов может быть наиболее эффективным. Наибольший успех фаготерапии однозначно достигается в замкнутых биологических системах с контролируемыми физическими условиями. При полевом земледелии таких идеализированных условий добиться почти невозможно, что не исключает успешного применения фагопрепаратов и в этом случае.

Однако и для товарного производства, и, в особенности, для производства семенного материала наибольшую значимость в наши дни приобретает растениеводство в условиях теплиц на субстрате по-

стоянного состава, с применением капельного полива и гидропонии. В этих случаях применение фаговых препаратов против своевременно и точно диагностируемых патогенных бактерий, вызывающих болезни растений, полностью оправдано и может применяться с высоким шансом на успех.

Резюмируя все вышесказанное, можно утверждать, что для успешного внедрения бактериофагов с целью контроля и лечения бактериальных заболеваний в промышленное растениеводство принципиальных препятствий нет. Необходимо предпринять ряд шагов скорее технологического и методологического плана, чтобы этот перспективный подход стал неотъемлемой частью «зеленых агротехнологий».

Литература

- Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B. *et al.* Phage therapy for plant disease control // *Cur. Pharmac. Biotechnol.* 2010. V. 11(1). P. 48–57.
- Fujiwara A. *et al.* Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages // *App. and Envir. Microbiol.* 2011. V. 77. P. 4155–4162.
- Gill J.J., Hyman, P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy // *Cur. Pharmac. Biotechnol.* 2010. V. 11(1). P. 2–14.
- Goodridge L.D. Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: Fact or fiction? // *Trends in Biotechnol.* 2004. V. 22(8). P. 384–385.
- Jones J.B., *et al.* Bacteriophages for plant disease control // *Ann. Rev. of Phytopathol.* 2007. V. 45. P. 245–262.

В публикации использованы фотографии А.Н. Игнатова (Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская обл.) и рисунки Жени Власова



НАНОайболиты

БАКТЕРИОФАГИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБИОТИКАМ В ВЕТЕРИНАРИИ

Среди болезней сельскохозяйственных животных на первом месте стоят инфекционные заболевания, которые приносят существенный экономический ущерб из-за гибели животных и потери продуктивности, а также немалых затрат на организацию мер профилактики и борьбы. Особое значение имеют инфекции, которым наряду с животными подвержен и человек: сибирская язва, бешенство, бруцеллез, лептоспироз, сальмонеллез и т. д.

Ключевые слова: сальмонеллы, куры, бактериофаги, антибиотики, эффлюкс, антибиотикоустойчивость, инфекционная безопасность.

Key words: salmonella, chicken, bacteriophages, antibiotics, efflux, drug resistance, infectious safety

Одной из ключевых, наиболее активно развивающихся отраслей сельского хозяйства во многих странах мира сегодня является птицеводство. Ежегодно производится около 300 млн т мяса, для чего выращивается более 500 млрд бройлеров. И примерно 5% этой птицы погибает, т. е. каждую секунду от различных болезней умирает более 800 цыплят! Одной из основных причин смертности сельскохозяйственной птицы служат болезнетворные бактерии, в том числе опасные для человека. Для нашей страны наиболее актуальны такие патогены, как листерии, иерсинии, сальмонеллы, кампилобактерии и некоторые штаммы кишечной палочки.

Нужно заметить, что с проблемой инфекционных болезней рано или поздно сталкивается любое животноводческое предприятие, вне зависимости от того, на чем оно специализируется, будь то крупный или мелкий рогатый скот, свиньи, пушные животные и т. д. Обеспечение здоровья животных и безопасности продуктов питания требует активного противодействия патогенным микроорганизмам. С момента открытия

пенициллина в 1928 г. основным средством борьбы с бактериальными инфекциями стали антибиотики. Однако несмотря на постоянное появление на рынке все новых препаратов, появление мультирезистентных форм бактерий, устойчивых практически ко всем антибиотикам, стало серьезной проблемой не только в здравоохранении, но и в ветеринарии.

Применение антибиотиков в животноводстве и птицеводстве постоянно подвергается критике, так как, с одной стороны, они могут попадать в продукты питания человека, с другой — стимулировать возникновение новых лекарственно-устойчивых возбудителей инфекций. К тому же использование антибиотиков в сельском хозяйстве не всегда является обоснованным, а порой даже вредит. К примеру, при заболеваниях свиней применение антибиотиков часто является «палкой о двух концах». Так, при клостридиозе бактерия, защищаясь от антибиотика, иногда может образовывать споры и вырабатывать токсины, вызывая токсикоинфекцию и повреждая слизистую кишечника. А в случае репродуктивно-респираторного синдрома антибиотики часто



АФОНЮШКИН Василий Николаевич – кандидат биологических наук, ветеринарный врач, ведущий инженер лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), заведующий сектором молекулярной биологии Сибирского федерального научного центра агrobiотехнологий РАН. Автор и соавтор 84 научных работ и 13 патентов

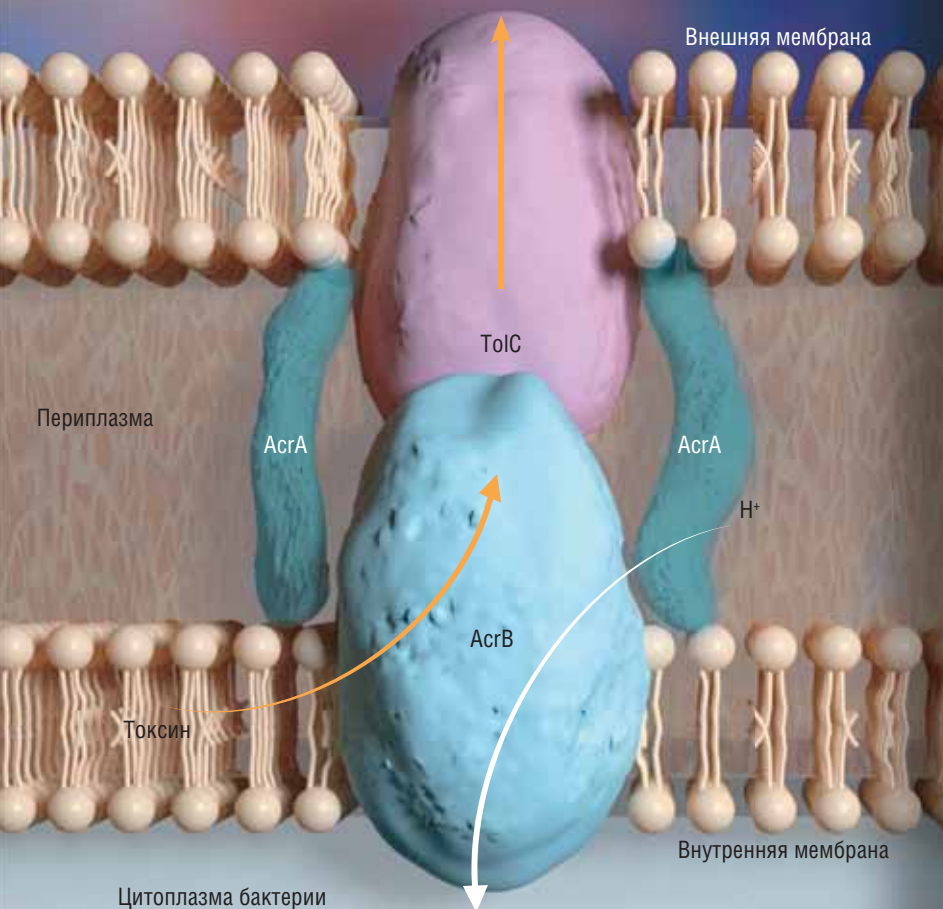


ФИЛИПЕНКО Максим Леонидович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник и заведующий группой фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Лауреат премии им. А.А. Баева по программе «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники гражданского значения» (2000), премии «Призвание» (2015). Автор и соавтор свыше 360 научных работ и 15 патентов



КОЗЛОВА Юлия Николаевна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 8 научных работ и 5 патентов

© В. Н. Афонюшкин, М. Л. Филипенко, Ю. Н. Козлова



За последнее десятилетие все чаще обнаруживаются штаммы сальмонелл и кишечной палочки, обладающие устойчивостью к широкому спектру антибиотиков. Такое свойство у этих микроорганизмов нередко обеспечивается за счет **эффлюкса** — активного выведения токсинов из бактериальной клетки, осуществляемого транспортными (насосными) системами белковой природы (Hernando-Amado *et al.*, 2016). Эффлюкс веществ запускается с использованием сложной системы регуляции в ответ на такие воздействия, как окислительный стресс или обработка некоторыми катионными дезинфектантами, которые широко используются при отказе птицефабрик от антибиотиков. В результате за счет эффлюкса бактерии становятся резистентными к гентамицину, хлорамфениколу, флорфениколу и другим антибиотикам, не давая им связаться с мишенью внутри клетки.

Бактериальная эффлюкс-помпа представляет собой канал, соединяющий цитоплазму клетки с внешней средой, по которому выводятся токсины, несущие положительный заряд. Канал сформирован белками AcrA и TolC, а энергозависимый процесс выведения из цитоплазмы и периплазмы токсичных соединений осуществляет белок AcrB.
По: (Klaas, 2009)

усугубляют течение этой вирусной инфекции, провоцируя воспаление в легких.

Но если мы ограничим применение антибиотиков для животных, не приведет ли это к росту заражения людей патогенными бактериями и, соответственно, росту потребления антибиотиков уже в человеческой популяции? Кроме того, сегодня известны механизмы, которые могут приводить к появлению у бактерий антибиотикорезистентности даже при отсутствии контакта с этими препаратами.

Сложная ситуация подогревает интерес к поиску новых терапевтических средств, которые могут заменить или дополнить антибиотики в борьбе с инфекционными заболеваниями. Поиски альтернативных путей лечения бактериальных инфекций сразу выдвинули на первое место *фаготерапию* и *фагопрофилактику* (Акимкин и др., 2010).

От лаборатории — к птицефабрике

Пионерами в использовании фагов для лечения животных можно считать английских ученых У. Смита и его коллег из Института исследования заболеваний животных (Smith *et al.*, 1987). В своих исследованиях на лабораторных мышах, экспериментально зараженных кишечной палочкой, они обнаружили, что даже единичное введение препарата бактериофага значительно уменьшало количество жизнеспособных клеток *E. coli* в пищеварительном тракте. Позже они повторили этот опыт на телятах, ягнятах и морских свинках, зараженных вирулентным штаммом кишечной палочки, вызывающим диарею. И в этих случаях фаготера-

Этот цыпленок, пораженный метапневмовирусом, вызывающим тяжелую респираторную инфекцию, имеет большой шанс погибнуть при заражении некоторыми бактериями, так как антибиотики в этом случае оказываются малоэффективными.
Фото В. Афонюшкина

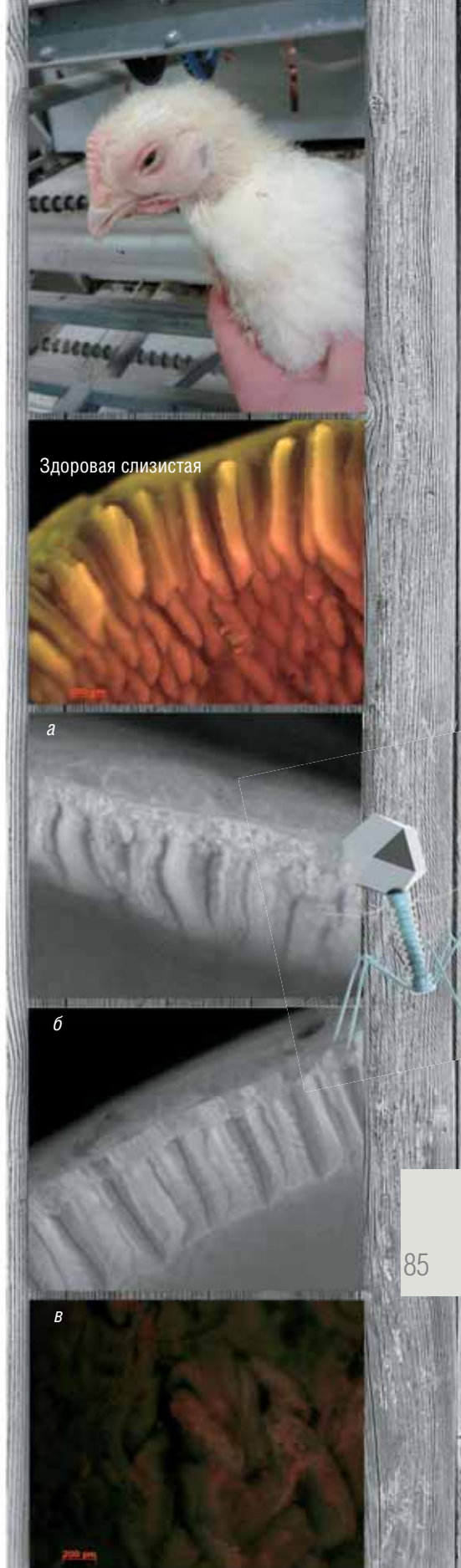
пия снижала численность бактерий в желудочно-кишечном тракте, а также смягчала такие связанные с инфекцией симптомы, как обезвоживание. В результате практически все инфицированные животные выжили.

Применение препаратов бактериофагов в условиях крупных агрокомплексов имеет свои особенности, благоприятствующие подобной терапии. Системы обеспечения биологической безопасности на больших сельскохозяйственных предприятиях достаточно эффективно ограничивают разнообразие инфекций и, соответственно, число видов патогенных микроорганизмов там намного меньше, чем в человеческой популяции. По этой причине инфекции на таких предприятиях высоко воспроизводимы, и диагноз, поставленный в одном птичнике, можно экстраполировать на другие. Но при этом надо помнить, что бактерии могут защититься от фагов. Так, эксперименты на бактериальных монокультурах показали, что в результате применения фагов уже через несколько часов возникают бактериальные клетки, устойчивые к их действию. Кроме того, в отличие от антибиотиков с их относительно широким спектром действия, не существует такого «супербактериофага», который будет атаковать большое число различных штаммов и видов микроорганизмов. Поэтому в практике обычно используют сложные коктейли бактериофагов.

В наши дни становится технически и экономически возможным вести поиск бактериофагов и производство соответствующего биопрепарата для отдельно взятого предприятия. Уничтожить таким образом весь спектр патогенных бактерий нельзя, однако против наиболее важных в санитарном или эпидемическом плане бактерий вполне реально подобрать и применить эффективные бактериофаги.

На сегодня уже имеется успешный опыт применения препаратов бактериофагов против сальмонелл и кишечной палочки на крупных птицефабриках. Например, на одной из отечественных птицефабрик, где наблюдался аномально высокий (50–70%) уровень инфицированности цыплят-бройлеров сальмонеллой, за несколько месяцев удалось снизить этот показатель до нерегистрируемых значений. К тому же на крупных птицефабриках и свинокомплексах, где имеется высокая скученность животных, распространение бактериофагов, вакцинных штаммов вирусов и полезных, пробиотических штаммов бактерий идет по типу эпидемического процесса, что значительно удешевляет и повышает эффективность борьбы с инфекциями.

У кур были обнаружены дистрофические и воспалительные изменения в слизистой тонкого отдела кишечника, при которых использование антибиотиков не только малоэффективно, но даже повышает смертность особей:
а — вирусный энтерит двенадцатиперстной кишки, осложненный бактериальной инфекцией;
б — отек слизистой двенадцатиперстной кишки на фоне неизвестной, предположительно вирусной инфекции; в — некроз слизистой тонкого отдела кишечника на фоне поражения клостридиями и эймериями. Фото В. Афонюшкина



Здоровая слизистая

а

б

в

ДЛЯ МЕНЬШИХ БРАТЬЕВ

Домашние питомцы, такие как кошки и собаки, также подвержены бактериальным инфекционным заболеваниям. При этом они намного плотнее, чем сельскохозяйственные животные, контактируют с людьми, поэтому могут служить более опасным источником инфекций, таких как лептоспироз, при котором поражаются почки и печень, или кишечный иерсиниоз, который у человека сопровождается хроническими болями в животе, диареей и иногда даже приводит к гибели. Высокпатогенные формы кишечной палочки, сальмонеллы, кампилобактерии и клостридии тоже могут попасть в организм человека от собак и кошек, вызывая кишечные инфекции, бактериальный сепсис и гемолитикоуремический синдром. Применение бактериофагов для лечения животных в такой ситуации было бы одновременно и хорошим средством профилактики инфекций у их хозяев, причем в этом случае отсутствовал бы риск заразиться от животных антибиотикоустойчивыми бактериями.

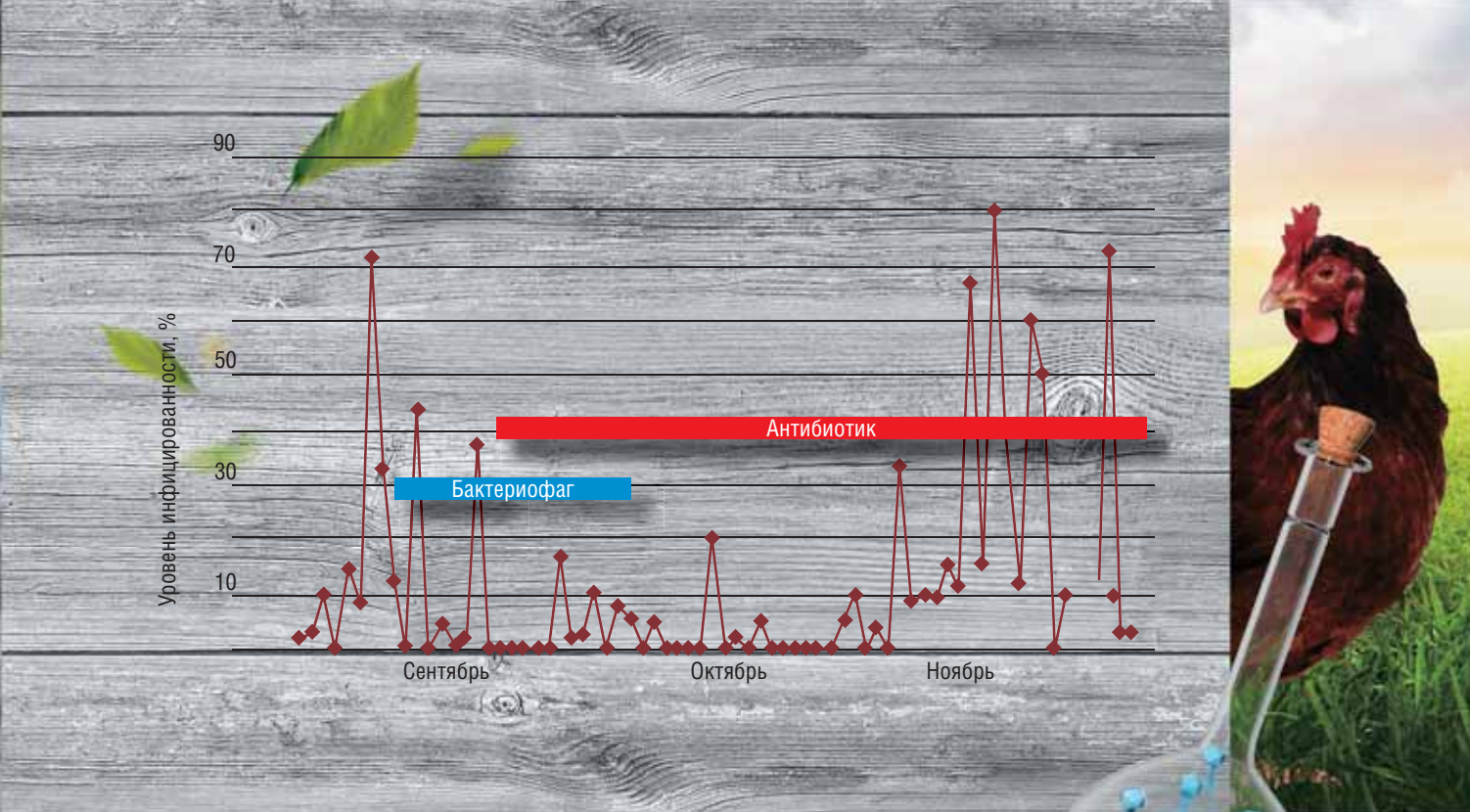
К сожалению, в арсенале ветеринарии на сегодняшний день нет препаратов бактериофагов против таких тяжелых болезней, как лептоспироз и иерсиниоз, хотя исследования по созданию поливалентных противоиерсиниозных бактериофагов ведутся достаточно активно. Поиск в сети, в том числе на форумах владельцев животных, свидетельствует, что в перечень средств для лечения животных ветеринары включают «человеческие» фаговые препараты: «бактерофаг стафилококковый» и «бактериофаг стрептококковый», которые используются для лечения и профилактики гнойных заболеваний кожи и слизистых оболочек, а также других инфекций с участием этих бактерий; «пиобактериофаг комбинированный» («пиополифаг»), который обладает широким спектром антибактериальной активности и используется при лечении ряда гнойно-воспалительных заболеваний. Для специфической терапии колибактериоза, вызываемого патогенными штаммами кишечной палочки, который приводит к гибели щенков и котят, можно использовать «бактериофаг против паратифа и колибактериоза»



В приведенном выше примере с сальмонеллой в процессе фаготерапии произошла смена серотипа бактерий, в результате чего появился новый штамм *Infantis*, оказавшийся устойчивым к используемому бактериофагу. Этот факт наводит на мысль, что бактериофаги могут выступать для бактерий как фактор межвидовой конкуренции. Ведь бактерии рода *Salmonella* встречаются в кишечнике в относительно низкой концентрации, и можно ожидать, что между разными видами и подвидами этого рода конкуренция будет отсутствовать (Antunes *et al.*, 2016). Однако последовательная смена различных серотипов сальмонелл в популяциях кур позволяет предполагать неслучайный характер этого явления.

Так, в настоящее время сальмонеллы серотипов *Gallinarum* и *Pullorum* практически не обнаруживаются в отличие от серотипа *Enteritidis*, который, в свою очередь, по частоте встречаемости намного уступает новому серотипу *Infantis*. Интересно, что именно в период роста инфицированности кур сальмонеллами серотипа *Infantis* сотрудники Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» выделили из образцов довольно много бактериофагов, активных в отношении сальмонелл серотипа *Enteritidis*, но с очень большим трудом удалось обнаружить штамм бактериофага против сальмонелл серотипа *Infantis*. Конечно, этому явлению может быть найдено немало объяснений, но и версия участия бактериофагов в вытеснении бактерий близкородственных генетических групп выглядит весьма правдоподобной.

В научной литературе достаточно широко освещены и явление *полигостальной специфичности* (способности заражать широкий спектр видов бактерий) в отношении разных видов бактерий, и феномен разной фагорезистентности у разных штаммов внутри одного вида бактерий по отношению к одному и тому же бактериофагу. Очевидно, что штамм бактерии, способный поддерживать существование бактериофага без гибели клетки-хозяина, может получить эволюционное преимущество, так как станет причиной гибели бактерий-конкурентов, чувствительных



Эксперименты по применению препарата бактериофага на российской птицефабрике*, проведенные специалистами СФНЦА РАН, показали, что фаготерапия в целом способствовала уменьшению уровня инфицированности птицы сальмонеллами. Относительно низкий уровень инфицированности наблюдался еще некоторое время спустя после прекращения применения фагового препарата за счет спонтанной циркуляции бактериофага на птицефабрике. В дальнейшем уровень сальмонеллоносительства возрос до исходных значений несмотря на использование антибиотика ципрофлоксацин.

*Каждая точка графика соответствует отдельному птичнику с поголовьем 40 тыс. цыплят-бройлеров в возрасте 41 день

к бактериофагу. Этот пример показывает, как много различных биологических идей можно извлечь, наблюдая взаимоотношения бактерий с бактериофагами. Кроме того, изучая спонтанное распространение бактериофагов по птицефабрикам и свинофермам, мы можем совершенно безопасно моделировать эпидемии.

Безусловно, в ближайшем будущем бактериофаги не смогут заменить антибиотики. Но в ситуациях, когда антибиотики уже не помогают, а также, когда нужно снять риск возникновения антибиотикоустойчивых штаммов бактерий, бактериофаги должны занять свое законное место.

В ветеринарии использование бактериофагов намного перспективнее, чем в медицине. Ведь новые ветеринарные лекарства быстрее выводятся на рынок, чем лекарства для человека. К тому же в крупных животноводческих хозяйствах специалисты сталкиваются с меньшим разнообразием инфекций при диагностике, чем у людей, что упрощает этап формирования коллекций бактерий и подбора бактериальных вирусов.

Литература

Андреева И. С., Соловьянова Н. А., Афонюшкин В. Н. и др. Перспективы фаготерапии сальмонеллезов птицы в сельскохозяйственном производстве // Современное общество, образование и наука: Сб. науч. тр. по материалам Международной научно-практической конференции. 2013. С. 10–13.

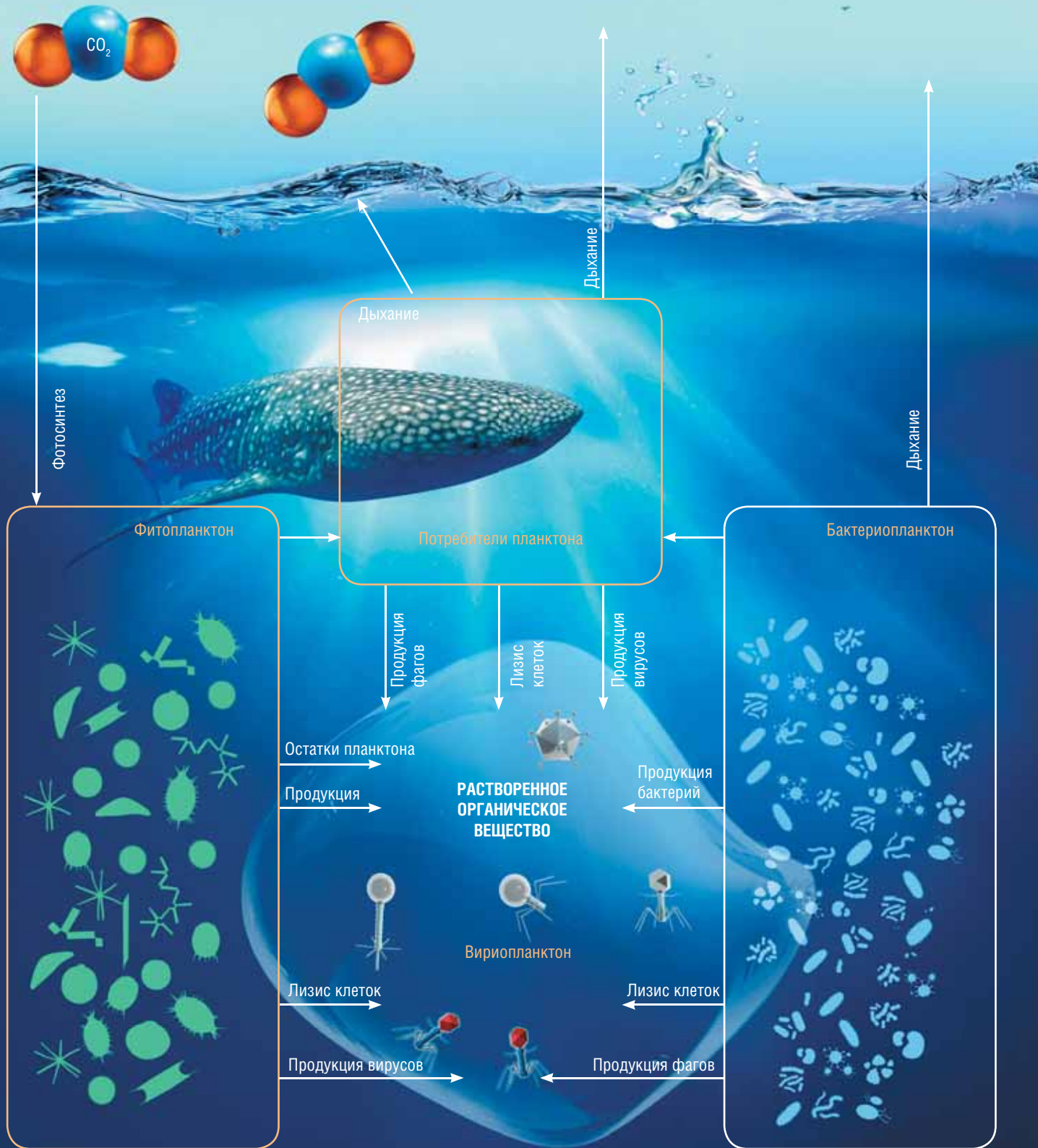
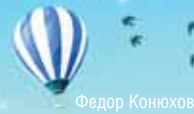
Акмикин В. Г., Дарбеева О. С., Колков В. Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и клинические перспективы // Клиническая практика. 2010. Т. 4. С. 48–54.

Antunes P., Mourão J., Campos J., Peixe L. Salmonellosis: the role of poultry meat // Clin. Microbiol Infect. 2016. V. 22. P. 110–121.

Klaas M. Pos, Trinity revealed: Stoichiometric complex assembly of a bacterial multidrug efflux pump // PNAS. V. 106. N. 17. P. 6893–6894, doi: 10.1073/pnas.0902837106

Smith, H. W., Huggins, M. B., Shaw, K. M. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment // J. Gen. Microbiol. 1987. V. 133. P. 1127–1135.





В каждой капле воды — ВИРУСЫ!

Везде, где есть жизнь, есть вирусы. Водная среда, занимающая большую часть нашей планеты, в которой сосуществует огромное число различных организмов, создает прекрасные условия и для жизни вирусов. В водных экосистемах вирусы атакуют все живые организмы – от бактерий до китов. Оставим за рамками рассмотрения вирусы крупных организмов и останемся в микромире – в мире микроскопических организмов, которые являются основой пищевых цепей и, как выясняется, многих глобальных процессов



ЛИХОШВАЙ Елена Валентиновна – доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом ультраструктуры клетки Лимнологического института СО РАН (Иркутск). Автор и соавтор свыше 170 научных работ и монографий

Первая информация о количестве вирусных частиц в водных экосистемах, потрясая исследователей, была получена в 1989 г. (Bergh *et al.*, 1989). Материал из проб морской воды был осажден центрифугированием прямо на сеточки с пленкой-подложкой и исследован в трансмиссионном (просвечивающем) электронном микроскопе. В одном миллилитре оказалось до $2,5 \times 10^8$ вирусных частиц, представленных в основном фагами с характерной морфологией (капсид-отросток, или голова-хвост), что в 10^3 – 10^7 раз превышало концентрацию фагов, определенную путем традиционного высева проб на бактериальный газон (метод бляшек). Разница на порядки объясняется тем, что не все бактерии культивируются, и не все вирусы-фаги инфицируют именно бактерии.

Дальнейшие работы дали ошеломляющие результаты. Оказалось, что вирусы – самые многочисленные «организмы» океанов. Если поставить все 10^{30} вирусных частиц, обитающих в Мировом океане, в цепочку, то она растянется на 60 галактик(!) (Suttle, 2007). Они содержат около 200 мега-тонн углерода (Suttle, 2013).

Ясно, что такой объект водных экосистем нельзя оставлять без внимания. И это не «просто биомасса».

Бактериофаги в глобальном круговороте

В следующем после открытия водных вирусов году появились результаты исследований, проведенных во время весеннего развития водорослей и питающихся бактериями флагеллят (Bratbak *et al.*, 1990). Оказалось, что концентрация вирусных частиц во время весеннего цветения меняется, достигая максимума в конце развития диатомей, когда в слизи отмерших или прекративших деление клеток наблюдается самое большое число бактерий

На современной схеме глобального круговорота органического вещества и биогенных элементов в водных экосистемах важное место занимает «вириопланктон», под которым подразумевается вся совокупность вирусов одноклеточных водных организмов, включая бактериофаги – вирусы бактерий, цианофаги – вирусы цианобактерий, вирусы архей, альговирусы, поражающие эукариотические одноклеточные водоросли, вирусы протозоа, поражающие простейших, таких как амёбы и жгутиковые и вириофаги (вирусы вирусов). Как видно из схемы, вириопланктон влияет сразу на многие биогеохимические и экологические процессы в различных звеньях экосистемы.
По: (Wommack & Colwell, 2000)

Ключевые слова: водные экосистемы, вириопланктон, бактериофаги, цианофаги, вирусы архей, три домена жизни.

Key words: aquatic ecosystems, viroplankton, bacteriophages, cyanophages, archaeal viruses, three domains of life

Вирусы (от лат. *virus* – «яд») формируют отдельный домен наряду с тремя другими «клеточными» доменами – бактериями, археями и эукариотами. В нем 7 порядков, включающих 29 семейств, и дополнительно 82 семейства, не отнесенных к каким-либо порядкам, и этот список пополняется (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Не будем спорить, живые они или не живые, просто они живут в особой окружающей среде – в живой клетке. Так же как рыба не может жить без воды, вирусы не могут жить без клетки. Но рыба без воды погибает, а вирусам клетка нужна только для размножения, вне клетки они могут сохраняться как угодно долго, то есть, вирусы даже более жизнеспособны, чем другие организмы!

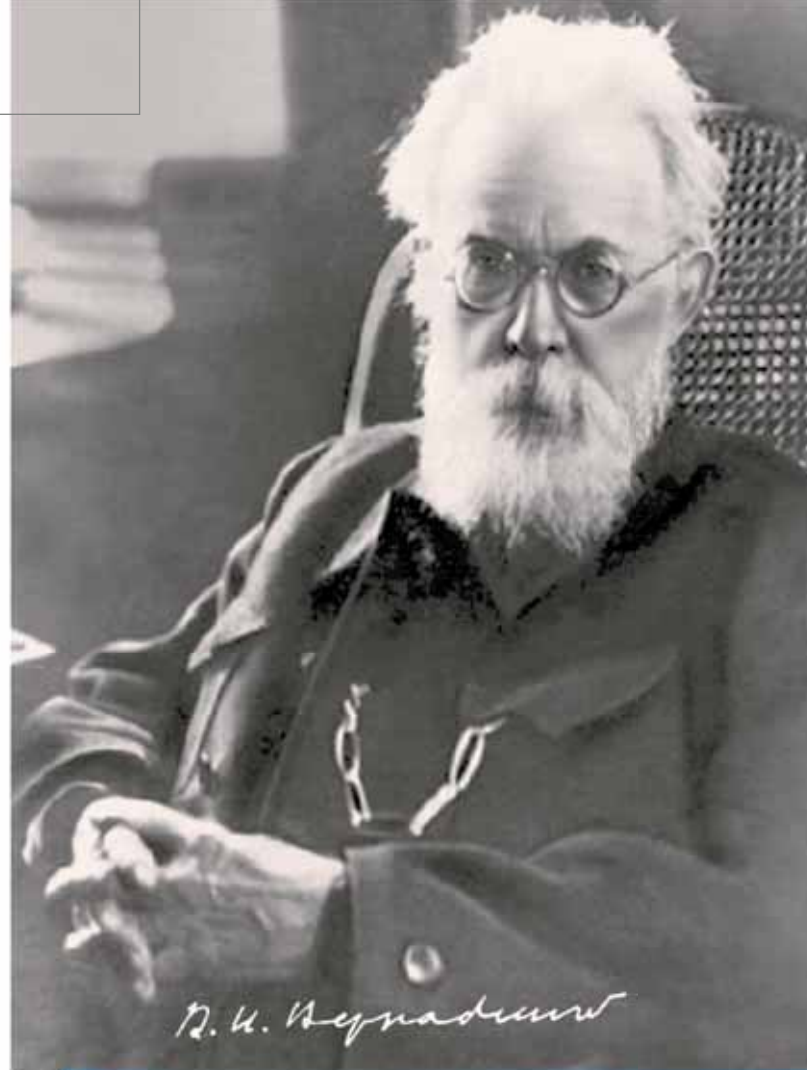
и вирусов. Эти наблюдения позволили авторам сделать предположение, что вирусы являются активными участниками микробной пищевой сети в качестве агентов, приводящих к лизису бактерий, тем самым, выводя часть бактериальной продукции из пищевой цепи «хищник-жертва», в данном случае – «флагелляты-бактерии».

Определение роли бактериофагов в водных экосистемах привело к существенному пересмотру представления о глобальном круговороте биогенных элементов. Раньше считалось, что гетеротрофные бактерии делают свое «гетеротрофное дело», расщепляя остатки органических веществ отмерших организмов и вращая по бактериальной петле циклы азота, углерода и других биогенных элементов. Введение в систему бактериофагов, активно и массово лизирующих бактерии, изменило эту схему.

Во-первых, удаление из экосистемы части бактерий, уничтоженной фагами, уменьшает интенсивность перевода нерастворимого (взвешенного в водной толще и осаждающегося на дно) биогенного вещества (различных частиц, отмерших организмов и др.) – в растворенное (расщепленное, гидролизованное). Таким образом фаги нарушают классическую пищевую цепь. Этот процесс был назван вирусным шунтом (Wilhelm, Suttle 1999).

Роль бактериофагов в глобальных циклах вещества и энергии была впервые отмечена выдающимся российским ученым академиком В.И. Вернадским, еще в 1927 г. опубликовавшим в журнале «Природа» свою пионерную работу «Бактериофаг и скорость передачи жизни в биосфере».

По: (В.И. Вернадский, Киев: НАН Украины, 2011. Том 4. Книга 1, с. 392)



392

ВЫБРАНИЕ ПРАШ

X

Работы над бактериофагами открывают новые проявления жизни в биосфере. Во-первых, они указывают, что могут существовать организмы, еще более мелкие, чем бактерии, обладающие еще большей геохимической энергией. Скорость ее передачи для этих организмов, т. е. скорость передачи их жизни в биосфере, превышает в несколько раз скорость звуковых волн в атмосфере.

В соответствии с этим организмы эти не могут существовать без редкого разрушения той среды, в которой они размножаются. Вне тех организмов в которых они размножаются, они находятся в латентном состоянии. Вероятно, таковы все организмы, размеры которых отвечают порядку тел 10^9 а. Организмы порядка 10^9 а (т. е. сотых долей микрона) могут существовать — проявлять активную геохимическую энергию — только внутри живого вещества, его интенсивно разрушая. Организмы этого и следующего порядка, 10^8 а (т. е. десятых долей микрона), лежат вне поля тяготения — живут в поле молекулярных сил.

Только организмы порядка 10^9 а и выше входят в область проявления сил, которым подчинены мы сами, попадают в наше обычное пространство.

Такое живое вещество в этой доступной непосредственному решению наших органов чувств среде — в поле тяготения — стремится в своем бытии достигнуть всюдности, проникнуть всюду, заполнить среду до конца. Оно достигает этого своей способностью к приспособлению к среде, способностью, действующей неустанно и непрерывно сотни миллионов, по-видимому, миллиарды лет. Приспособляемость жизни необычайна, и формы ее проявления бесконечны. Идет, по-видимому, расширение поля жизни [11, стр. 112 и сл.].

В бактериофагах мы наблюдаем то же явление в молекулярно-термодинамическом поле. Жизнь и здесь достигает своего возможного физического предела.

Мы не знаем, проявлением чего является это основное свойство живого тела, его стремление заполнить любое пространство — давление жизни.

Его проявление и в поле тяготения, и в поле молекулярных сил, по-видимому, указывает, что сила, которой оно служит выражением, выходит за пределы энергии планеты.

По оценкам авторов, через этот шунт может проходить до четверти первичной продукции углерода океана.

Во-вторых, разрушение бактерий приводит к высвобождению из них органических веществ, за увеличением концентрации которых в среде следует изменение сообщества других микроскопических организмов – микроводорослей. Одни из них ответят на это активным ростом, «цветением», другие будут угнетены. Понимание этих последствий привело к пересмотру не только схемы глобального круговорота органического вещества и биогенных элементов, но и структурно-функциональной организации водных экосистем в целом. Было введено понятие вириопланктон (Wommack, Colwell, 2000). Согласно новой схеме глобального круговорота органического вещества и биогенных элементов водных экосистем вириопланктон влияет на многие биогеохимические и экологические процессы, включая цикл питания, дыхания и распределение веществ в различных звеньях экосистемы.

В-третьих, морфологическое разнообразие бактериофагов в водных экосистемах велико, эта «армия» может избирательно поражать различных хозяев, приводя к изменению их соотношения в сообществах водных экосистем.

Количественная мультитрофическая модель, созданная авторским коллективом океанологов и математиков описывает влияние морских вирусов на микробные пищевые сети и процессы, проходящие в экосистемах. Согласно этой модели водные экосистемы, содержащие вирусы, будут иметь усиленный круговорот органического вещества, уменьшенный перенос этого вещества на более высокие трофические уровни и увеличенную валовую первичную продуктивность (Weitz *et al.*, 2014). Авторы модели считают, что в оценках круговорота углерода и азота необходимо учитывать роль вирусов, так как они являются важной составляющей пищевых сетей и регулируют глобальные биогеохимические циклы.

Цианофаги – особый случай?

Цианобактерии (синезеленые водоросли), хотя и относятся к домену *Bacteria*, благодаря способности к фотосинтезу играют иную нежели гетеротрофные бактерии роль в водных экосистемах. Это одни из самых древних организмов. Они доминировали на ранних стадиях эволюции биосферы Земли и определяли биогеохимические циклы. Их бурное развитие вызвало изменение атмосферы, обогатило ее кислородом, что сделало возможным появление других организмов и направило эволюцию биосферы нашей планеты. Можно предположить, что цианофагов тогда еще не было.

И сегодня среди цианобактерий есть экстремофилы – виды, прекрасно существующие в горячих источниках,

Вирус морской диатомы *Chaetoceros debilis* CdebDNAV – сохраняет инфекционность при широком диапазоне температур (от 20°C до -196°C) без добавления криопротекторов (Nagasaki, 2008).

Вирусы токсичной красной водоросли *Heterosigma akashiwo* сохраняют литическую активность в донных отложениях (Lawrence, 2002).

Цианофаги могут сохраняться в осадках до 100 лет (Suttle, 2000).

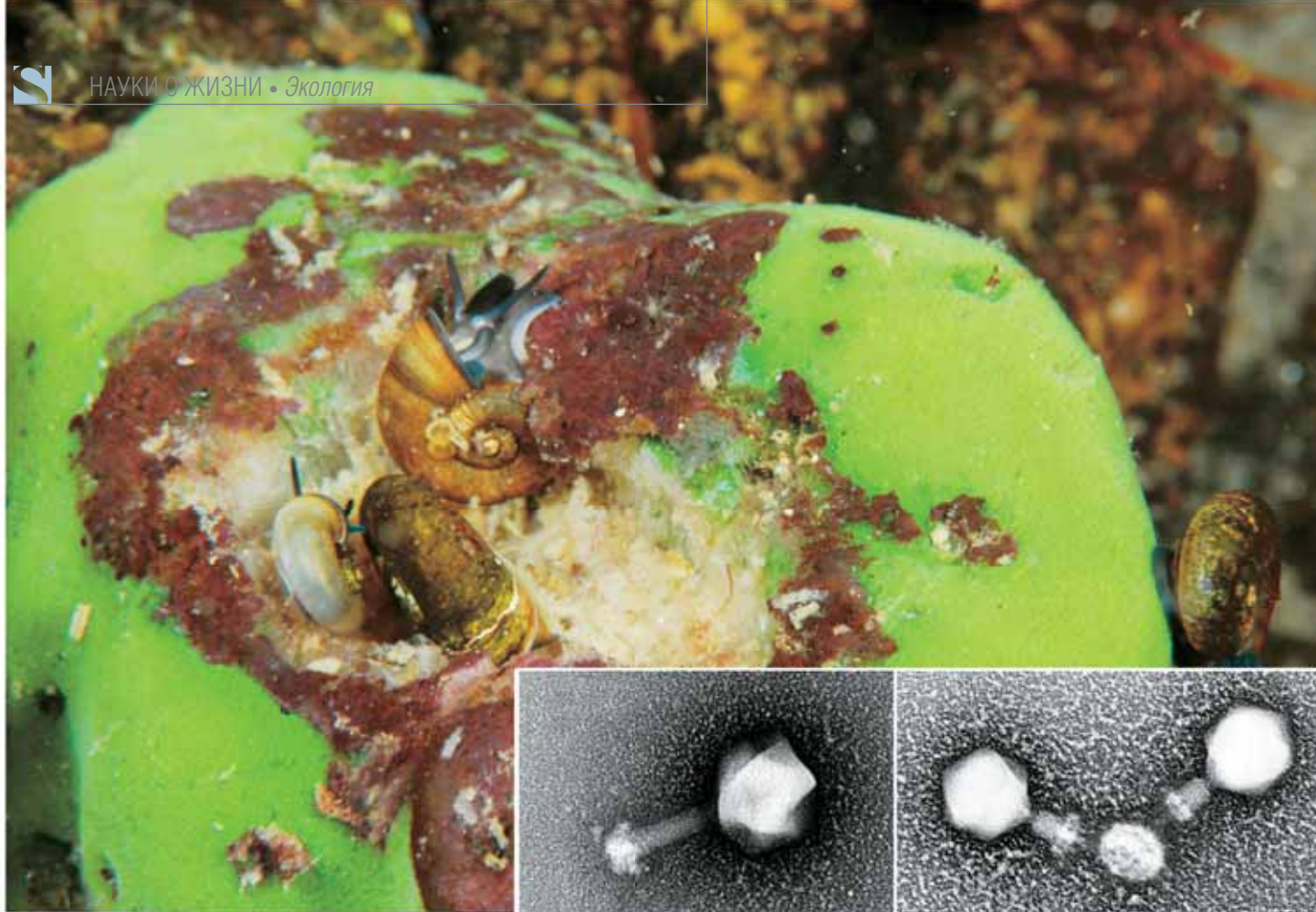
Гигантский вирус амёб *Pithovirus sibericum* – выделен из вечной мерзлоты возрастом 30 тыс. лет (Legendre *et al.*, 2014).

жарких пустынях, а также арктических и антарктических условиях. Если у таких видов есть цианофаги, то насколько они, эти цианофаги, уникальны?

В современных морских и пресноводных водоемах цианобактерии многочисленны и разнообразны: они обитают в водной толще, на дне, на водной растительности и различных субстратах. За цианобактериями закрепилась «дурная слава» – их бурное цветение делает водоемы неприглядными, а цианотоксины, выделяемые некоторыми видами, делают воду непригодной для питья, а некоторые из них – смертельно опасны. Возможно ли получение биопрепаратов на основе цианофагов, применение которых решило бы эти проблемы? Насколько хорошо изучены цианофаги?

Активное изучение цианофагов началось в 60-х гг. прошлого века. Сравнивая данные детальных наблюдений за развитием чистых альгокультур цианобактерий и других водорослей в лабораторных условиях и водорослей в природе Роберт В. Краусс (Robert W. Krauss) задумался над вопросом, почему лабораторные культуры могут месяцами сохранять жизнеспособность при низкой освещенности и скудном питании, а в природе «цветение» водорослей быстро прекращается даже в стабильных условиях окружающей среды? В 1960 г. на совещании, посвященном проблемам водоснабжения мегаполисов, он высказал предположение, что причиной быстрого разрушения водорослей могут быть «другие организмы» – фаги или сходные с ними вирусы (Krauss, 1961).

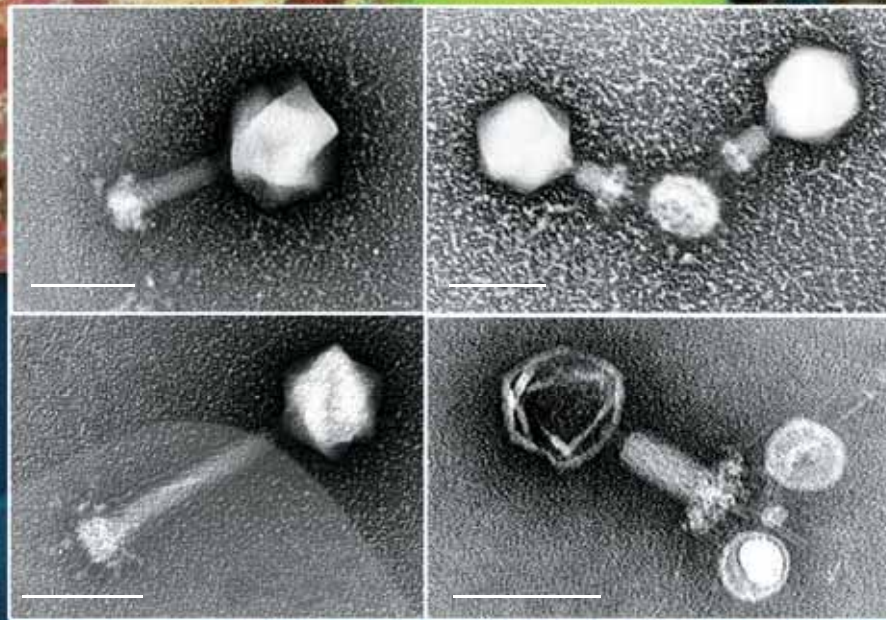
Поскольку пресноводные нитчатые цианобактерии легко культивируются, именно из них и были выделены первые цианофаги – вирусные частицы в форме икосаэдра без хвоста диаметром 66 нм, о чем последовало короткое сообщение в *Science* (Safferman, Morris, 1963). Ими были инфицированы нитчатые цианобактерии *Lyngbya*, *Plectonema* и *Phormidium*. За последующие десять лет были выявлены фаги у других цианобактерий, в том числе пикопланктонных (*Synechococcus*, *Microcystis*) и нитчатых, формирующих гетероцисты



(*Anabena*, *Nostoc*). Пробы для исследования были получены, в основном, из сточных вод и очистных сооружений.

Морские цианофаги были впервые выделены только в 1981 г. (Moisa *et al.*, 1981), они инфицировали нитчатые и одиночные цианобактерии в Черном море. Сообщение об этом оставалось без внимания почти десять лет – до тех пор, пока не вышла работа, в которой было показано, что значительная часть цианобактерий в морях инфицирована вирусами (Proctor, Fuhrman, 1990). В дальнейшем выяснилось, что инфекционные цианофаги могут быть выделены прямо из морской воды и содержатся в ней в высоких концентрациях.

Например, в Мексиканском заливе число цианофагов, инфицирующих определенные культивируемые штаммы *Synechococcus*, может достигать одного миллиона в одном



Зона на теле губки, пораженная цианобактериями (вверху). Фото И. Ханаева (ЛИН СО РАН)

На электронных микрофотографиях представлены примеры «хвостатых» бактериофагов семейства Myoviridae с сократительным хвостовым отростком (внизу). Фото: Public Library of Science journal (<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030144>)

ЗА РАЗНООБРАЗИЕМ – НА БАЙКАЛ!

В настоящее время согласно Международной классификации и таксономии вирусов (ICTV) бактериофаги, в зависимости от типа нуклеиновой кислоты разделяют на ДНК- и РНК-содержащие, которые, в свою очередь, разделяются на семейства по морфологическим признакам.

Исторически исследования водных бактериофагов связаны со сточными водами, где обнаруживаются колифаги, – бактериофаги кишечной палочки. Но на самом деле задача гораздо шире – обнаружить разнообразные фаги, поражающие другие бактерии, а не только *Escherichia coli*, или новые неизвестные фаги с возможными новыми свойствами. Практически одновременно с введением понятия вириопланктона в морской среде, были начаты исследования бактериофагов в воде озера Байкал. Сначала были выявлены фаги, поражающие присутствующую в воде кишечную палочку (Дрюккер, Масленников, 1998), а с 2002 г. для определения морфологии бактериофагов

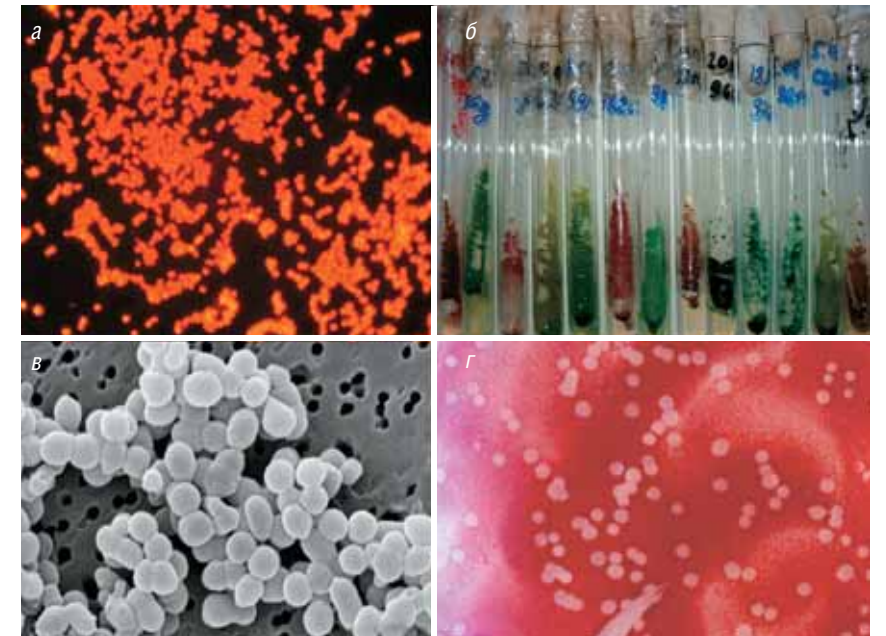
стали использовать трансмиссионную электронную микроскопию.

В Байкале за рекордно долгий для пресноводных водоемов период существования, несмотря на климатические катаклизмы (а, может, и благодаря им) сформировалась уникальная биота, с большим видовым богатством и высоким уровнем эндемизма практически во всех группах организмов. Как оказалось, из десяти известных семейств ДНК-содержащих бактериофагов в Байкале обитают морфологически разнообразные представители девяти из них (*Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Fuselloviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae*, *Rudoviridae*). Кроме того, обнаружено и несколько морфотипов неизвестного систематического положения (Дрюккер, Дутова, 2006, 2009). Таким образом, огромное биоразнообразие, характерное для флоры и фауны озера Байкал, распространяется и на фаги.

Пикопланктонные цианобактерии, обитатели водной толщи:

- а – флуоресцентная микроскопия;
- б – изолированные штаммы пикопланктонных цианобактерий с различной окраской вследствие разного состава фотосинтетических пигментов;
- в – сканирующая электронная микроскопия;
- г – штамм *Synechococcus* sp., инфицированный цианофагами, с характерными бляшками лизиса.

Фото О. Бельых (ЛИН, СО РАН)



миллилитре. На долю этих цианофагов может приходиться 10% всех обнаруженных в пробе воды вирусов, они имеют сезонную динамику, следуют за динамикой развития *Synechococcus* и активно атакуют хозяина, когда концентрация его клеток в среде достигает максимальных величин. Цианофаги обнаруживаются и в донных осадках, где они могут сохранять инфекционность более 100 лет, то есть осадки можно рассматривать как важный резервуар цианофагов, который может время от времени «обогащать» экосистему (Christon, 2000).

Интересно, что пресноводные и морские цианофаги родственны (Wilhelm *et al.*, 200). Морфологически цианофаги ничем особенно от бактериофагов не отличаются и относятся к тем же семействам – в основном, «хвостатым» отряду *Caudovirales*.

Вирусы древнейших

Археи – это прокариоты, то есть, также как и бактерии, – «доядерные» организмы. По названию домена *Archaea* видно, что их считают одними из древнейших организмов на Земле. Морфологически археи сходны с бактериями, а вот генетически, как недавно подтвердил анализ полных геномов представителей 92 филумов бактерий, 26 филумов архей и всех пяти супергрупп эукариотических организмов, археи ближе к эукариотам (Hug *et al.*, 2016).

В гиперэкстремальных средах археи – это зачастую единственные живые организмы. Они как бы очерчивают границы биосферы, за пределами которых жизни нет. Отметим, что археи встречаются и в «мягких» условиях

среды – в пищеварительном тракте людей и термитов, почвах и донных осадках (Pikuta *et al.*, 2007).

Ферменты архей применяются в пищевой промышленности, так как могут работать при высоких температурах, а ДНК-полимераза архей *Pyrococcus furiosus* используется в ПЦР (полимеразной цепной реакции). Сами археи являются компонентом очистных сооружений, обеспечивая анаэробное разложение сточных вод; используются при обогащении руд ценных металлов. Ясно, что в промышленном производстве лизис архей вирусами – большая неприятность.

Для размножения «в неволе» археям требуются особые условия, большинство из них анаэробы, то есть кислород для них – яд, и культивировать в лабораторных условиях их удается не все и не всем. По этой причине изучение вирусов архей находится в самом начале. К настоящему времени выделено около 140 вирусов архей – это всего несколько процентов от числа известных вирусов (фагов) прокариот. Тем не менее, уже обнаружено много фактов, обращающих на себя внимание (Pina *et al.*, 2011; Prangishvili, 2013; Pietila *et al.*, 2014; Prangishvili *et al.*, 2016).

Вирусы архей морфологически более разнообразны, чем бактериофаги. Помимо «обычных» хвостатых икосаэдров, среди вирусов архей есть сферические и линейные; ветреновидные, бутылко- и каплевидные, и даже уникальные, например, в форме лимона (Pietila *et al.*, 2014). При этом, большинство вирусов архей из высокосолёных вод сходны по морфологии с бактериофагами и имеют с ними общих предков. В частности, по данным анализа геномов, электронной криомикроскопии и модельных реконструкций изображений, родственны хвостатые фаги архей и бактерий (Pietila *et al.*, 2013). Другое дело – вирусы термофильных архей. Они имеют разнообразную и необычную морфологию, что свидетельствует об их независимом происхождении (Prangishvili, 2013).

Есть мнение, что природа генома и пути его репликации в клетке хозяина не являются самыми главными вопросами с точки зрения самого вируса (Abrescia *et al.*, 2012). Для сохранения «генофонда» и выживания в экстремальных условиях, в которых обитают их хозяева, вирусам нужна надежная защита. И она была изобретена и многим вирусам пригодилась.

Структурные исследования вирусных капсидов показали, что бесхвостые икосаэдры, инфицирующие архей, бактерий и эукариот, имеют общего предка (Abrescia *et al.*, 2012). Например, структурные сходства имеют белки оболочки нитчатых вирусов табачной мозаики, двух вирусов архей из рода *Acidianus* и вируса гепатита В. Несмотря на низкую гомологию аминокислотных последовательностей, белки вирусов архей могут иметь сходные элементы третичной структуры с вирусами других доменов (Dallas *et al.*, 2014). А совсем недавно

был описан нитевидный вирус гипертермофильной археи *Pyrobaculum*, который имеет уникальную среди ДНК-содержащих нитевидных вирусов структуру вириона. Его линейный геном заключен в трехслойный панцирь, состоящий из двух белковых слоев и дополнительной наружной оболочки. Вирион организован в виде суперспирали подобно вирусам Эбола и Марбург, но они являются РНК-содержащими (Rensen *et al.*, 2016). (картинку мы не взяли – она слишком мелкая)

Таким образом, изучение вирусов архей дает новое представление о «мире вирусов», выявляя глубокие эволюционные взаимоотношения между вирусами, инфицирующими хозяев из всех трех доменов живых организмов. Обнаруженные сведения поддерживают гипотезу о том, что последний общий предок клеточных организмов инфицировался большим количеством разных вирусов (Pietila *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2015).

Каждую секунду в океане происходит 10^{23} вирусных инфекций. Каждая инфекция имеет возможность для введения новой генетической информации в организм и в вирусное потомство, способствуя таким образом эволюции как сообществ хозяина, так и вирусов (Suttle, 2007). И хотя важность водных вирусов уже стала очевидной, на многие вопросы наука пока ответить не может.

В заключение приведу цитату из лекции одного известного морского биолога: «Если вам интересно, как функционирует планета, то сначала надо понять, что главное – это не киты, которые, конечно, важны. Главное – это микробная жизнь, которую мы не можем увидеть глазами» (Suttle, 2013).

Литература

Bergh Ø, Borsheim KY, Bratbak G, Heldal M. Abundance of viruses found in aquatic environments // *Nature*. 1989. V. 340. P. 467–468.

Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K. *et al.* A new view of the tree of life // *Nature Microbiol.* 2016. 11 Apr. N. 16048. DOI 110.1038.

Pietilä M.K., Demina T.A., Atanasova N. S., Oksanen H.M., Bamford D.H. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts // *Trends in Microbiology*. 2014. V. 2. N. 6. P. 334–344.

Prangishvili D. The wonderful world of archaeal viruses // *Annu. Rev. Microbiol.* 2013. V. 67. P. 565–85.

Suttle C.A. Viruses in the sea // *Nature*. 2005. V. 437. P. 356–361.

Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал // Докл. РАН. 2009. Т. 427, № 2. С. 277–281.

Автор благодарит Г.И. Филиппову (ЛИН СО РАН, Иркутск) за помощь в подготовке публикации



НАУКА
из первых рук

SCIENCE
First Hand

Теперь Вы можете **ОФОРМИТЬ И ОПЛАТИТЬ ПОДПИСКУ**
НА ЭЛЕКТРОННУЮ ВЕРСИЮ (pdf) на сайте журнала www.scfh.ru:

http://scfh.ru/sub_re/ на русском языке
http://scfh.ru/en/sub_re/ на английском языке

ВСЕ АРХИВ журнала с 2004 по 2016 гг. – на сайте: <http://scfh.ru/archive/> –
на русском языке, <http://scfh.ru/en/archive/> – на английском языке

ПОДПИСКА

Стоимость подписки на полугодие – 840 руб.
Стоимость подписки на год – 1680 руб.

На сайте журнала «НАУКА из первых рук» www.scfh.ru вы можете:

● **Оформить подписку на печатную версию журнала**

3 номера печатной версии журнала, первое полугодие 2017 г. – 840 руб.

3 номера печатной версии журнала, второе полугодие 2017 г. – 840 руб.

6 номеров печатной версии журнала, 2017 г. – 1680 руб.

В стоимость подписки включена доставка журнала заказной бандеролью.

Оригиналы бухгалтерских документов для юридических лиц (договор, счет-фактура и накладная) будут высланы Вам почтой.

● **Купить отдельные выпуски печатной версии журнала «НАУКА из первых рук»**

Печатные выпуски журнала доставляются по почте

● **Способы оплаты**

Электронные платежи: через систему приема платежей Робокасса (банковскими картами, с помощью сервисов мобильной коммерции – МТС, Мегафон, Билайн – через интернет-банк ведущих Банков РФ, через банкоматы и т. д.)

С помощью квитанции: после оформления заказа Вам будет выслана квитанция ПД-4 для оплаты заказа в ближайшем отделении Вашего Банка

● **По всем вопросам обращаться:**

Тел.: 8 (383) 330-27-22

Факс: 8 (383) 330-26-67

e-mail: zakaz@infolio-press.ru

● **Платежные реквизиты:**

ООО «ИНФОЛИО»

ИНН 5408148073, КПП 540801001

Р/счет 407 02 810 603 120 002 214

в Новосибирский филиал

ПАО «МДМ БАНК»,

г. Новосибирск

Кор/счет 30101810850040000775

БИК 045004775

● **Оформить подписку на электронную версию журнала (PDF)**

3 номера электронной версии журнала (PDF), первое полугодие 2017 г. – 290 руб.

3 номера электронной версии журнала (PDF), второе полугодие 2017 г. – 290 руб.

6 номеров электронной версии журнала (PDF), 2017 г. – 590 руб.

Оплаченный номер электронной версии журнала (PDF) Вы получаете сразу после выхода очередного номера на указанный Вами адрес электронной почты

● **Купить отдельные выпуски электронной версии журнала «НАУКА из первых рук» (PDF)**

● **Получить электронный доступ**

к статье за 29 руб., к выпуску за 79 руб., ко всем статьям на сайте журнала: на 1 мес. за 99 руб., на 6 мес. за 299 руб., на 12 мес. за 599 руб.

При покупке электронного доступа вы получаете возможность читать статьи сразу после успешной оплаты.

По адресу <http://scfh.ru/en/> Вы можете получить электронный доступ к англоязычной версии журнала *SCIENCE First Hand*

● **Подписка на печатную версию по каталогам:**

Агентство «Урал-Пресс»: www.ural-press.ru

Агентство «Деловая пресса»: www.delpress.ru

Информнаука: www.informnauka.com

МК-периодика: www.periodicals.ru

Почта России: www.pochta.ru/

Юнисервиспресс: www.uspress.ru/

Подписка на электронную версию журнала:

Научная электронная библиотека:
www.e-library.ru

Пресса.ру: www.pressa.ru

В стоимость подписки включена доставка журналов заказной бандеролью

В мире науки

SCIENTIFIC AMERICAN

Ежемесячный научно-информационный журнал

www.sci-ru.org

№8-9 и 10 2016



Взлет млекопитающих

Вопрос о том, как и когда млекопитающие стали господствующей группой позвоночных животных на Земле, долгое время оставался для ученых загадкой. Многочисленные окаменелости, найденные за последние 15 лет, помогли им лучше понять роль, которую сыграло вымирание динозавров в ранней эволюции зверей.

Видеоигры — тренажер для мозга

Охота на зомби и борьба с инопланетянами, по данным последних исследований, могут способствовать стабильному улучшению умственных способностей.

Оранжевый туман

Вьетнам настаивает на том, что последствия распыления вооруженными силами США дефолианта Agent Orange отражаются на здоровье детей и внуков тех, кто контактировал с этим веществом во время войны. Ученые пока не пришли к единому мнению по этому вопросу.



Самое пустое место в космосе

Недавно астрономы обнаружили суперпустоту, простирающуюся на 1,8 млрд световых лет. Для того чтобы определить, она ли ответственна за «похолодание» в реликтовом излучении, необходимо больше данных.

Семь лет пути за 60 граммами астероида

Межпланетная станция OSIRIS-REx в своем путешествии к астероиду Бенну пролетит новый свет и на глубокое прошлое, и на далекое будущее.

Нейробиология зомбирования

Ученые выяснили, каким образом яд, впрыснутый маленькой осой, делает таракана ее марионеткой.

Секрет скорости

Новые прорывы в исследовании биомеханики спринтерской скорости могут помочь атлетам значительно улучшить свои олимпийские достижения.



*Нитевидные бактериофаги после негативного контрастирования
фосфорно-вольфрамовой кислотой.
Электронная микроскопия Е. Рябчиковой*

ISSN 18-10-3960



9 771810 396003 70